

本文引用:杨秀林,张亚平,何全中,等.一种新的人 Beclin1 转录本的克隆、原核表达和纯化[J].新乡医学院学报,2017,34(8):682-686. DOI:10.7683/xyxyxb.2017.08.005.

【基础研究】

一种新的人 Beclin1 转录本的克隆、原核表达和纯化

杨秀林¹, 张亚平², 何全中¹, 谢云飞², 潘莹¹

(1. 新乡医学院第三附属医院妇产科, 河南 新乡 453003; 2. 新乡医学院生命科学技术学院, 河南 新乡 453003)

摘要: **目的** 克隆新的人 Beclin1 转录本 DEL-E8-E10 并对其所编码的蛋白质进行表达和纯化。**方法** 以 SiHa 细胞的 cDNA 作为模板进行聚合酶链式反应 (PCR) 扩增 DEL-E8-E10 基因, 构建原核表达载体 pET32a-DEL-E8-E10。在大肠杆菌中诱导表达 His-DEL-E8-E10 融合蛋白, 利用镍柱亲和层析纯化 His-DEL-E8-E10 融合蛋白。**结果** 克隆到 DEL-E8-E10 基因, 成功构建原核表达载体 pET32a-DEL-E8-E10, 并获得可溶性表达。利用镍柱亲和层析纯化 His-DEL-E8-E10 融合蛋白。**结论** 纯化出 His-DEL-E8-E10 融合蛋白, 为进一步研究新的转录本 DEL-E8-E10 编码蛋白质与宫颈癌之间的关系提供了实验基础。

关键词: DEL-E8-E10; 转录本; 纯化

中图分类号: R34 **文献标志码:** A **文章编号:** 1004-7239(2017)08-0682-05

Cloning, prokaryotic expression and purification of a new human Beclin1 transcript variant

YANG Xiu-lin¹, ZHANG Ya-ping², HE Quan-zhong¹, XIE Yun-fei², PAN Ying¹

(1. Department of Gynaecology and Obstetrics, the Third Affiliated Hospital of Xinxiang Medical University, Xinxiang 453003, Henan Province, China; 2. College of Life Sciences and Technology, Xinxiang Medical University, Xinxiang 453003, Henan Province, China)

Abstract: **Objective** To clone a new Beclin1 transcript variant DEL-E8-E10, and express and purify the its encoded protein. **Methods** The DEL-E8-E10 gene was amplified by polymerase chain reaction (PCR) using cDNA of SiHa cells, and the prokaryotic expression vector pET32a-DEL-E8-E10 was constructed. His-DEL-E8-E10 fusion protein was induced in Escherichia coli and purified by nickel column affinity chromatography. **Results** The prokaryotic expression vector pET32a-DEL-E8-E10 was successfully constructed and the soluble expression was obtained by cloning the DEL-E8-E10 gene. The His-DEL-E8-E10 fusion protein was purified by nickel column affinity chromatography. **Conclusion** The purified His-DEL-E8-E10 fusion protein provides an experimental basis for the further study of the relationship between DEL-E8-E10 protein and cervical cancer.

Key words: DEL-E8-E10; transcript variant; purification

Beclin1 也称为 BECN1, 是酵母自噬基因 Atg6/Vps30 的同源基因, 由 LIANG 等^[1-2]于 1998 年首次发现鉴定, 是哺乳动物参与自噬的特异性基因, 在发育、肿瘤的形成、神经退行性疾病和心血管系统中发挥着重要作用^[3-5]。人 Beclin1 位于人类第 17 号染色体(17q21), 与小鼠和大鼠的 Beclin1 高度同源。Beclin1 在卵巢癌、乳腺癌、前列腺癌和胆管癌等肿瘤中表现为单等位基因缺失和表达水平的下调^[6-7], 在脑肿瘤中 Beclin1 的表达水平也呈明显的下调趋势^[8]。王赞宏等^[9]研究表明, Beclin1 促进 HeLa 细胞的自噬和凋亡, 继而抑制其生长。然而, 乙酰化的 Beclin1 可以促进肿瘤的生长^[10]。作者在克隆 Bec-

lin1 基因时, 发现 1 个新的转录本, 本研究将其在大肠杆菌 BL21(DE3)中进行表达和纯化, 旨在为下一步研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 质粒和菌株 pET32a 质粒购自 GE Healthcare 公司, *E. coli* Top10 和大肠杆菌 BL21(DE3)菌株由本实验室保存, SiHa 细胞由新乡医学院千新来教授馈赠。

1.2 试剂与仪器 引物由苏州金唯智生物科技有限公司合成, Pyrobest DNA 聚合酶购自宝生物工程(大连)有限公司, 限制性内切酶和 T4 DNA 连接酶购自美国 New England Biolabs 公司, 质粒提取试剂盒、DNA 胶回收试剂盒、异丙基硫代半乳糖苷(isopropyl-b-D-thiogalactopyranoside, IPTG)、乙二胺四乙酸(ethylenediamine tetraacetic acid, EDTA)、溶菌酶、磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS)、咪

DOI:10.7683/xyxyxb.2017.08.005

收稿日期:2017-02-13

作者简介:杨秀林(1989-),女,河南安阳人,硕士研究生在读,研究方向:妇科肿瘤。

通信作者:潘莹(1970-),女,回族,河南驻马店人,博士,副教授,硕士研究生导师,研究方向:妇科肿瘤;E-mail:panying@xxmu.edu.cn。

唑、LB 培养液、曲拉通 X-100(Triton X-100)、丙烯酰胺、N,N'-亚甲基双丙烯酰胺、脱脂奶粉、琼脂糖和十二烷基磺酸钠(sodium dodecanesulfonate, SDS)购自上海生工生物工程股份有限公司,镍柱购自美国 Clontech 公司,聚偏氟乙烯(polyvinylidene fluoride, PVDF)膜和 Western 印迹化学发光显影液购自美国 Milipore 公司,DNA 分子量标准购自天根生化科技(北京)有限公司,蛋白分子量标准购自北京全式金生物技术有限公司,组氨酸标签的抗体购自北京康为世纪生物科技有限公司,山羊抗小鼠 IgG 的抗体购自北京中杉金桥生物技术有限公司,凝胶成像系统 Amersham™ Imager 600 购自美国 GE Healthcare 公司。

1.3 方法

1.3.1 新的 Beclin1 转录本的扩增 根据 Beclin1 的 mRNA 序列(BC010276)设计引物,以人 SiHa 细胞的 cDNA 为模板,扩增 Beclin1。正义链引物 5'-CCGGAATTCGCATGGAAGGGTCTAAGACG-3',反义链引物 5'-GCGTCGACTCATTTGTTATAAAATTGTGAG-3'。

1.3.2 DEL-E8-E10 原核表达载体的构建 用 BamH I 和 Sal I 切聚合酶链式反应产物 DEL-E8-E10 和 pET32a,胶回收载体 pET32a 和目的片段(1 145 bp),用 T4 DNA 连接酶将片段和载体连接起来,转化到 E. coli Top10,挑选并培养单克隆,提质粒,用 Xho I 筛选重组质粒 pET32a-DEL-E8-E10, DNA 测序进行鉴定。

1.3.3 DEL-E8-E10 在大肠杆菌中的表达 将质粒 pET32a-DEL-E8-E10 转化 E. coli BL21(DE3),挑取单克隆接种于 LB 培养基中,37℃培养过夜。取过夜培养菌液,以 1:100 接种于预热的 LB 培养基中,37℃继续培养至对数期,加入 IPTG,至终浓度为 12.5、25.0、50.0、100.0 μmol·L⁻¹,25℃诱导。诱导 5 h 后取 1 mL 菌悬液,离心,收集菌体,加入裂解液(150 mmol·L⁻¹ NaCl,10 mmol·L⁻¹ Tris-HCl, pH 7.5,1 mmol·L⁻¹ EDTA,100 mg·L⁻¹ 溶菌酶,体积分数 3% Triton X-100),超声波破碎(参数设置为:工作 2 s,间隔 3 s,总时间 2 min,功率 200 W),4℃12 000 r·min⁻¹离心 10 min,收集上清,蛋白凝胶电泳检测。如果较未诱导的样品在相对分子质量 61 000 处多 1 个条带,则说明融合蛋白 His-DEL-E8-E10 表达。

1.3.4 DEL-E8-E10 的纯化 取 1 mL 体积分数为 50% 的镍柱装入 5 mL 纯化柱中,用 30 mL 的 PBS(pH 8.0)漂洗和平衡镍柱。将上清和平衡好的介质混合放入离心管中,4℃孵育 2 h。将孵育完的混合液加入到纯化柱中,用 30 mL 的 PBS 洗涤镍柱,

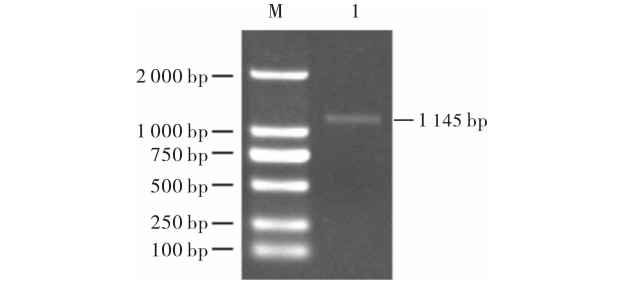
然后加入 2 mL 含有 100 mmol·L⁻¹咪唑的 PBS 进行洗脱,得到融合蛋白 His-DEL-E8-E10。

1.3.5 蛋白电泳和 Western 印迹检测融合蛋白 取适量超声破碎的上清液和 5×SDS 上样缓冲液混合,100℃加热 5 min,使用丙烯酰胺质量分数 10% 的分离胶进行 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)分离蛋白,考马斯亮蓝 R-250 染色。

电泳结束后,将分离胶上的蛋白转移到 PVDF 膜上,用质量分数 5% 的脱脂奶粉封闭 PVDF 膜 1 h,加入小鼠抗组氨酸标签的单克隆抗体,室温孵育 1 h,三羟甲基氨基甲烷吐温缓冲液(Tris-HCl buffered saline with Tween 20, TBST)洗涤 3 次,加入山羊抗小鼠的 IgG,室温孵育 40 min, TBST 洗涤 3 次,加入蛋白印迹化学发光试剂显影,使用 Amersham™ Imager 600 化学发光成像分析仪(美国 GE Healthcare)采集图像。

2 结果

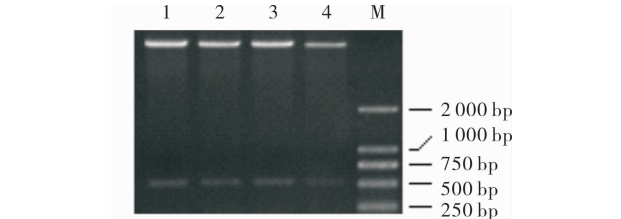
2.1 载体构建 琼脂糖凝胶电泳检测胶回收产物,可看到在 1 145 bp 处有一条带(图 1)。重组载体用 Xho I 进行酶切鉴定,可检测到大小为 512 bp 的条带(图 2)。



M:marker;1:DEL-E8-E10 的克隆。

图 1 DEL-E8-E10 的克隆

Fig.1 Clone of DEL-E8-E10



1~4:pET32a-DEL-E8-E10 的酶切鉴定;M:marker。

图 2 重组质粒 pET32a-DEL-E8-E10 的酶切鉴定

Fig.2 Identification of the recombinant plasmid pET32a-DEL-E8-E10 by enzyme digestion

2.2 DEL-E8-E10 的序列 将限制性内切酶验证阳性的重组表达载体进行 DNA 测序,测序结果与 Beclin1 的编码序列在线比对(<http://embnet.vital->

it. ch/software/LALIGN_form. html), 结果表明二者相似度为 84%。与 Beclin1 相比, 克隆到的新转录本减少 208 个碱基(685 ~ 831 bp、981 ~ 1 041 bp)(图 3)。缺失的核苷酸序列为 Beclin1 的 cDNA 的

第 8 个外显子和第 10 个外显子, 因而将该新转录本命名为 DEL-E8-E10。缺失的核苷酸造成部分密码子移位, 致使新转录本编码的蛋白质的氨基酸序列较 Beclin1 发生很大改变(图 4)。

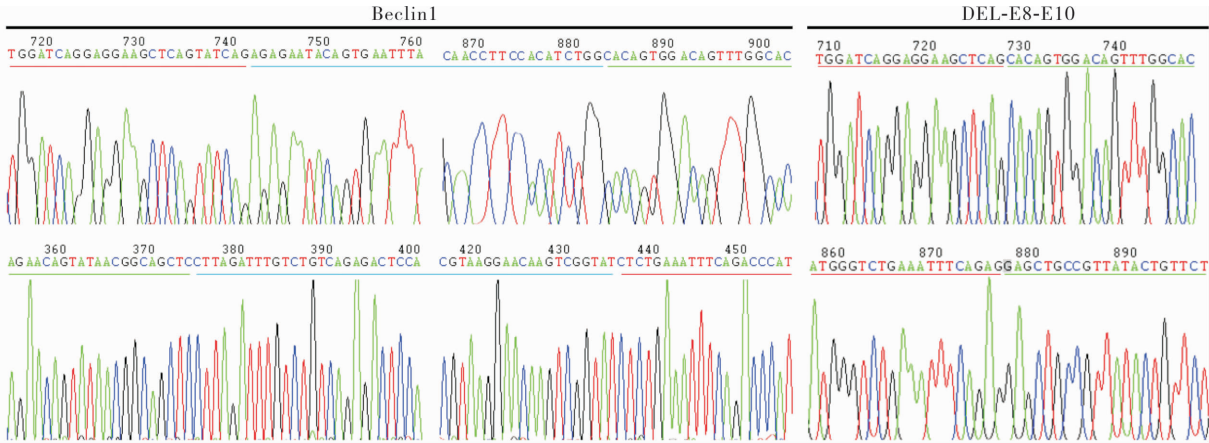


图 3 DEL-E8-E10 与 Beclin1 核苷酸序列比对
Fig.3 Comparison of nucleotide sequences between DEL-E8-E10 and Beclin1

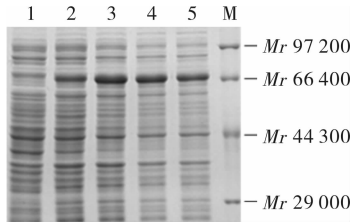
Beclin1	MEGSKTSNNSTMQVSFVCQRCSQPLKLDTSFKILDRVTIQELTAPLLTTAQAKPGETQEE	60
DEL-E8-E10	MEGSKTSNNSTMQVSFVCQRCSQPLKLDTSFKILDRVTIQELTAPLLTTAQAKPGETQEE	60
Beclin1	ETNSGEEPFIIETPRQDGVSRRFIPARMSTESANSFTLIGEASDGGTMENLSRRLKVTG	120
DEL-E8-E10	ETNSGEEPFIIETPRQDGVSRRFIPARMSTESANSFTLIGEASDGGTMENLSRRLKVTG	120
Beclin1	DLFDIMSGQTDVDHPLCEECDTLLDQLDTQLNVTENECQNYKRCLIEILEQMNEDDSEQL	180
DEL-E8-E10	DLFDIMSGQTDVDHPLCEECDTLLDQLDTQLNVTENECQNYKRCLIEILEQMNEDDSEQL	180
Beclin1	QMELKELALEEERLIQELEDVEKNRKIVAENLEKVQAEERLDQEEAQYQREYSEFKRQQ	240
DEL-E8-E10	QMELKELALEEERLIQELEDVEKNRKIVAENLEKVQAEERLDQEEAQ.....	228
Beclin1	LELDDELKSVENQMRYAQQLDKLLKKTNVFNATFHIWHSQGFGTINNFRGLRFLSPVPEWVN	300
DEL-E8-E10HSGQFGTINNFRGLRFLSPVPEWVN	252
Beclin1	EINAAWGQTVLLHALANKMGLKFQR.YRLVPYGNHSYLESITDKSKELPLYCSGGLRFF	359
DEL-E8-E10	EINAAW.QTVLLHALANKMGLKFQRScRytv1Ggcgfsq...ttSltmqww1S.....	302
Beclin1	WDNKFHDHAMVAFDCVQQFKEEVEKGETRFCLPYRMDVEKGKIEDTGGSGGSYSIKTQFN	419
DEL-E8-E10	Wt.....vcsssKkrlrKrhvFvfPtgwmwrKarlktgeavaapipsKpslt	350
Beclin1	SEEQWTKALKFMLTNLKWGLAWVSSQFYNK	449
DEL-E8-E10	lrssgqK.....1SSsc	362

图 4 DEL-E8-E10 与 Beclin1 的蛋白质序列比对
Fig.4 Comparison of protein sequence alignment between DEL-E8-E10 and Beclin1

2.3 融合蛋白的表达 用 12.5、25.0、50.0、100.0 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 IPTG 对已转化 pET32a-DEL-E8-E10 的 *E. coli* BL21 (DE3) 进行诱导表达, SDS-PAGE 的结果(图 5)显示融合蛋白 His-Beclin1 为可溶性表达, 相对分子质量和预期(61 000)相符合。比较不同 IPTG 浓度下的表达量可知, IPTG 浓度为 25 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时融合蛋白的表达量最高, 因此, 在大量诱导时 IPTG 的浓度设定为 25 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

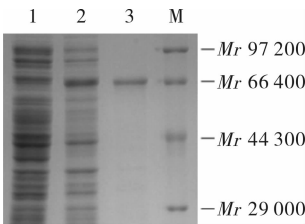
2.4 融合蛋白的纯化 将菌体超声波破碎后的上清液与镍柱低温孵育 3 h, 用含有 100 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 咪唑的 PBS 进行洗脱, SDS-PAGE 检测, 咪唑浓度为 100 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时洗脱下来的目的蛋白的量最多, 纯度较好。经过镍柱亲和层析, 纯化出了融合蛋白

His-DEL-E8-E10(图 6)。



1:未诱导;2:12.5 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ IPTG, 25 $^{\circ}\text{C}$ 诱导上清;3:25.0 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ IPTG, 25 $^{\circ}\text{C}$ 诱导上清;4:50.0 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ IPTG, 25 $^{\circ}\text{C}$ 诱导上清;5:100.0 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ IPTG, 25 $^{\circ}\text{C}$ 诱导上清;M:marker。

图 5 融合蛋白 His-DEL-E8-E10 的表达
Fig.5 Expression of fusion protein His-DEL-E8-E10



1:未诱导;2:25.0 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ IPTG,25 $^{\circ}\text{C}$ 诱导上清;3:洗脱液(含有 100 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 咪唑);M:marker。

图 6 融合蛋白 His-DEL-E8-E10 的纯化

Fig. 6 Purification of fusion protein His-DEL-E8-E10 protein

2.5 重组蛋白的鉴定 将纯化的融合蛋白进行 Western 印迹,结果进一步证实纯化的蛋白为目的蛋白(图 7)。



1:未诱导;2:25.0 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ IPTG,25 $^{\circ}\text{C}$ 诱导上清;3:洗脱液。

图 7 Western blot 检测 His-DEL-E8-E10

Fig. 7 Western blot analysis of His-DEL-E8-E10

3 讨论

大多数真核基因转录产生的 mRNA 是按照 1 种方式剪接为成熟的 mRNA,因而也只翻译成 1 种蛋白质。但是有些基因的 mRNA 可以通过一种特殊的剪接方式,产生 2 条或 2 条以上成熟的 mRNA,从而能翻译出 2 种及以上的蛋白质,这种特殊的剪接方式称为选择性剪接^[11-12]。在选择性剪接的 5 种类型^[13]中,外显子跳跃型的剪接方式在高等真核生物中最为普遍,大约占全部选择性剪接事件的 40%^[11]。外显子跳跃型剪接是指可变外显子在一部分成熟的 mRNA 中被当做内含子序列而剪接去除^[4,11,14-15]。本研究发现的 Beclin1 新的转录本 DEL-E8-E10 很可能是由于外显子跳跃剪接产生的,即错误地把 10 号外显子 3'末端的腺嘌呤核苷酸(adenine nucleotide, A)和鸟嘌呤核苷酸(guanine nucleotide, G)当成剪接信号,或者直接把第 10 号内含子 3'末端的 AG 当成剪接信号的导致第 10 号外显子被剪切除去;然而,第 8 号外显子的 3'末端为胸腺嘧啶核苷酸(thymine nucleotide, T)和 G,则不能被被认为是剪接信号,第 8 号内含子的 3'末端为 AG,则可以被当做剪接信号,致使第 8 号外显子被剪切除去^[11]。

在人类基因组中大约有 95% 的基因具有可变剪接的能力^[4]。为了研究基因表达调控的机制,提出了许多基因调控监测系统,其中之一为无义介导

的 mRNA 降解系统(nonsense-mediated mRNA decay, NMD)。NMD 系统是指存在于真核生物中的 mRNA 监测系统,该系统可以识别 mRNA 中的提前终止密码子(pre-mature termination codon, PTC),继而降解异常的 mRNA,避免截短的蛋白产物的积累,达到保护细胞的目的^[11,16-17]。在哺乳动物细胞中,PTC 位点的识别依赖于终止子与外显子-外显子连接位点之间的距离,当二者之间的距离大于 50~55 个核苷酸时,NMD 系统被触发并降解异常的 mRNA;当二者之间的距离小于 50~55 个核苷酸时,可变剪接体不会被破坏,将进一步翻译成相应的蛋白质^[11,18]。一些携带 PTC 位点的转录本仍然可以翻译成相应的蛋白质,这些异常的蛋白质将会导致机体疾病的产生,如老年痴呆症、白血病和肉瘤等^[19-21]。目前报道的 Beclin1 的转录本中 DEL-E11 因缺失第 11 个外显子致使 PTC 位点与最末端的外显子-外显子之间仅相距 24 个核苷酸,因而不是 NMD 系统的靶标。另一转录 Beclin1v1 因缺失第 9、10 和 11 号外显子使得其 PTC 位点与最末端的外显子-外显子之间相距 114 个核苷酸,二者的距离大于 50~55 个核苷酸,然而其仍然能够编码蛋白质^[22]。本研究发现的 Beclin1 的新的转录本 DEL-E8-E10 的 PTC 位点距最末端的外显子-外显子之间的距离也是 114 个核苷酸,其能否被 NMD 系统识别并降解,目前尚不清楚。李跃等^[23]研究表明,Beclin1 的表达量在非宫颈病变 12 例、宫颈上皮内瘤变(CIN II~III)15 例和子宫颈癌 50 例(无淋巴结转移患者 34 例,淋巴结转移患者 16 例)中依次下降,这意味着 Beclin1 的表达水平可能与子宫颈癌的发生和进展有关系。DEL-E8-E10 与宫颈癌的发生、发展之间的关系,以及其能否作为宫颈癌诊断的候选标志物等,这些问题需要做进一步的研究。

参考文献:

[1] LIANG X H,JACKSON S,SEAMAN M,*et al.* Induction of autophagy and inhibition of tumorigenesis by beclin1 [J]. *Nature*,1999, 402(6762):672-676.

[2] LIANG X H,KLEEMAN L K,JIANG H H,*et al.* Protection against fatal Sindbis virus encephalitis by Beclin1, a novel Bcl-2-interacting protein[J]. *J Virol*,1998,72(11):8586-8596.

[3] ZHONG Y,WANG Q J,LI X,*et al.* Distinct regulation of autophagic activity by Atg14L and Rubicon associated with Beclin1-phosphatidylinositol-3-kinase complex[J]. *Nat Cell Biol*,2009,11(4):468-476.

[4] WANG E T,SANDBERG R,LUO S,*et al.* Alternative isoform regulation in human tissue transcriptomes [J]. *Nature*,2008,456(7221):470-476.

[5] MAEJIMA Y,ISOBE M,SADOSHIMA J. Regulation of autophagy

- by Beclin1 in the heart[J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2016, 95:19-25.
- [6] MATHEW R, KARANTZA-WADSWORTH V, WHITE E. Role of autophagy in cancer[J]. *Nat Rev Cancer*, 2007, 7(12):961-967.
- [7] WANG T T, CAO Q H, CHEN M Y, *et al.* Beclin1 deficiency correlated with lymph node metastasis, predicts a distinct outcome in intrahepatic and extrahepatic cholangiocarcinoma[J]. *PLoS One*, 2013, 8(11):e80317.
- [8] MIRACCO C, COSCI E, OLIVERI G, *et al.* Protein and mRNA expression of autophagy gene Beclin1 in human brain tumours[J]. *Int J Oncol*, 2007, 30(2):429-436.
- [9] 王赞宏, 李莉, 段振玲. 自噬基因 Beclin1 对子宫颈癌 HeLa 细胞生长的作用及其机制[J]. 中华妇产科杂志, 2011, 46(2):125-131.
- [10] SUN T, LI X, ZHANG P, *et al.* Acetylation of Beclin1 inhibits autophagosome maturation and promotes tumour growth[J]. *Nat Commun*, 2015, 6:7215.
- [11] 刘青青. Beclin1 基因的选择性剪接研究及条件敲除小鼠的建立[D]. 苏州: 苏州大学, 2014.
- [12] 王赞宏. 自噬基因 Beclin1 与宫颈癌相关性的实验研究[D]. 成都: 四川大学, 2007.
- [13] 李稚锋, 王正志, 张成岗. 真核基因可变剪接研究现状与展望[J]. 生物信息学, 2004, 2(2):35-38.
- [14] FAIRBROTHER W G, YE H R F, SHARP P A, *et al.* Predictive identification of exonic splicing enhancers in human genes[J]. *Science*, 2002, 297(5583):1007-1013.
- [15] MODREK B, LEE C J. Alternative splicing in the human, mouse and rat genomes is associated with an increased frequency of exon creation and/or loss[J]. *Nature Genet*, 2003, 34(2):177-180.
- [16] KERVENIN S, JACOBSON A. NMD: a multifaceted response to premature translational termination[J]. *Nat Rev Mol Cell Biochem*, 2012, 13(11):700-712.
- [17] CHANG Y F, IMAM J S, WILKINSON M F. The nonsense-mediated decay RNA surveillance pathway[J]. *Annu Rev Biochem*, 2007, 76:51-74.
- [18] ZHANG Z, XIN D, WANG P, *et al.* Noisy splicing, more than expression regulation, explains why some exons are subject to nonsense-mediated mRNA decay[J]. *BMC Biol*, 2009, 7(1):23.
- [19] SZTAINBERG Y, KUPERMAN Y, ISSLER O, *et al.* A novel corticotropin-releasing factor receptor splice variant exhibits dominant negative activity: a putative link to stress-induced heart disease[J]. *FASEB J*, 2009, 23(7):2186-2196.
- [20] BATISTA E L JR, KANTARCI A I, HASTURK H, *et al.* Alternative splicing generates α diacylglycerol kinase α transcript that acts as a dominant-negative modulator of superoxide production in localized aggressive periodontitis[J]. *J Periodontol*, 2014, 85(7):934-943.
- [21] SALSAMAN J, PINDER J, TSE B, *et al.* The translation initiation factor 3 subunit eIF3K interacts with PML and associates with PML nuclear bodies[J]. *Exp Cell Res*, 2013, 319(17):2554-2565.
- [22] 程冰. 自噬相关蛋白 Beclin1 新剪接突变体 Beclin1v 在线粒体自噬调控中的研究[D]. 合肥: 中国科技大学, 2013.
- [23] 李跃, 渠源, 张颂婕, 等. 自噬基因 ARHI 与 Beclin1 在宫颈癌中国的表达及意义[J]. 中华临床医师杂志, 2013, 7(23):10648-10652.

(本文编辑:李胜利 英文编辑:徐自超)

(上接第 681 页)

- [2] WAGGONER D W, XU J, SINGH I, *et al.* Structural organization of mammalian lipid phosphate phosphatases: implications for signal transduction[J]. *Biochim Biophys Acta*, 1999, 1439(2):299-316.
- [3] KANO H, KAI M, WADA I. Phosphatidic acid phosphatase from mammalian tissues: discovery of channel-like proteins with unexpected functions[J]. *Biochim Biophys Acta*, 1997, 1348(1/2):56-62.
- [4] MANZANO R G, MARTINEZ-NAVARRO E M, FORTEZA J, *et al.* Microarray phosphatome profiling of breast cancer patients unveils a complex phosphatase regulatory role of the MAPK and PI3K pathways in estrogen receptor-negative breast cancers[J]. *Int J Oncol*, 2014, 45(6):2250-2266.
- [5] XU Z, SHEN M X, MA D Z, *et al.* TGF- β 1-promoted epithelial-to-mesenchymal transformation and cell adhesion contribute to TGF- β 1-enhanced cell migration in SMMC-7721 cells[J]. *Cell Res*, 2003, 13(5):343-350.
- [6] BRINDLEY D N, PILQUIL C. Lipid phosphate phosphatases and signaling[J]. *J Lipid Res*, 2009, 50(Suppl):225-230.
- [7] BENJAMIN D I, LI D S, LOWE W, *et al.* Diacylglycerol metabolism and signaling is a driving force underlying FASN inhibitor sensitivity in cancer cells[J]. *ACS Chem Biol*, 2015, 10(7):1616-1623.
- [8] TANG X, BENESCH M G, BRINDLEY D N. Lipid phosphate phosphatases and their roles in mammalian physiology and pathology[J]. *J Lipid Res*, 2015, 56(11):2048-2060.
- [9] TAKEUCHI M, HARIGAI M, MOMOHARA S, *et al.* Cloning and characterization of DPPL1 and DPPL2, representatives of a novel type of mammalian phosphatidate phosphatase[J]. *Gene*, 2007, 399(2):174-180.
- [10] DAHL E, KRISTIANSEN G, GOTTLÖB K, *et al.* Molecular profiling of laser-microdissected matched tumor and normal breast tissue identifies karyopherin α 2 as a potential novel prognostic marker in breast cancer[J]. *Clin Cancer Res*, 2006, 12(13):3950-3960.
- [11] HANAHAN D, WEINBERG R A. Hallmarks of cancer: the next generation[J]. *Cell*, 2011, 144(5):646-674.

(本文编辑:李胜利 英文编辑:徐自超)