论著

文章编号:1000-5404(2008)04-0318-04

肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体诱导 HeLa 细胞凋亡的差异蛋白质组分析

赖国旗[1],邱宗荫[2],向廷秀[3],宋 敏[4],胡小龙[5],何明忠[1],谭冬梅[1] (重庆医科大学:[1]实验动物中心,[2]医学检验系,临床检验诊断学省部共建教育部重点实验室,[3]附属第一医院消化内科,[4]药学院,[5]临床医学一系,重庆 400016)

摘 要:目的 比较分析肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体(TNF-related apoptosis-inducing ligand, TRAIL)诱导人宫颈癌细胞系 HeLa 细胞凋亡前后蛋白质组中的差异表达蛋白,以进一步了解 TRAIL 的作用机制。**方法** 以 TRAIL 诱导人宫颈癌细胞系 HeLa 细胞凋亡为模型,用双向电泳技术分离 HeLa 全细胞蛋白质,MALDI-TOF 质谱鉴定,MS-FIit 数据库分析,RT-PCR 半定量方法检测 JNK2 的表达。**结果** 鉴定得到 12 个明显的差异蛋白点,其中 8 个蛋白点上调,4 个蛋白点下调。JNK2 的表达与 TRAIL 有良好的量效关系。**结论** JNKK、MAPKAPK-2、Dip13 beta、SHPS-1、DDBb、JEM-1、Macoilin、Leucine-rich repeat-containing protein 14、Ena/VASP-like protein、PTPase-MEG2、GRB10 adaptor protein、THUMP domain-containing protein 1 为 TRAIL 诱导 HeLa 细胞凋亡的新的相关蛋白。

关键词: 肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体;HeLa 细胞;蛋白质组分析;RT-PCR

中图法分类号: R394-33;R73-362;R737.33 **文献标识码:** A

Differential proteomic analysis of HeLa cells induced by TRAIL

LAI Guo-qi[1], QIU Zong-yin[2], XIANG Ting-xiu[3], SONG Min[4], HU Xiao-long[5], HE Ming-zhong[1], TAN Dong-mei[1] ([1]Laboratory Animal Center, [2]Key Laboratory of Clinical Medical Diagnostics, Ministry of Education, [3]Department of Gastroenterology, The First Affiliated Hospital, [4]Department of Pharmacy, [5]Department One of Clinic Medicine, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract: Objective To detect the differential proteins between HeLa cells treated and untreated by TRAIL so as to further understand the mechanisms of apoptosis induced by TRAIL in HeLa cells. **Methods** The differential proteins were observed by 2D electrophoresis, identified by matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight-mass spectrometry (MALDI-TOF-MS) and analyzed by MS Fit. The expression of JNK2 was examined by semi-quantitative RT-PCR method. **Results** There were twelve differential proteins between HeLa cells treated and untreated by TRAIL, 8 up-regulated and 4 down-regulated. There was a good dose-effect relationship between JNK2 and TRAIL. **Conclusion** JNKK, MAPKAPK-2, Dip13 beta, SHPS-1, DDBb, JEM-1, Macoilin, Leucine-rich repeat-containing protein 14, Ena/VASP-like protein, PTPase-MEG2, GRB10 adaptor protein, THUMP domain-containing protein 1 take part in the apoptosis of HeLa cells induced by TRAIL.

Key words: TNF-related apoptosis-inducing ligand; HeLa cells; Proteomics; RT-PCR

肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体(TNF-related apoptosis-inducing ligand, TRAIL)基因能选择性地诱导肿瘤细胞发生凋亡,且对正常细胞及人体组织安全无毒,因此受到了国内外学者的广泛重视,有望成为新的抗肿瘤药物和治疗自身免疫疾病药物[1,2]。然而,目前对 TRAIL 诱导 HeLa 细胞凋亡作用的机制尚不清楚。本研究应用比较蛋白质组学分析策略,以人宫颈癌细胞系 HeLa 为研究模型,以双向电泳分离 TRAIL 干预前后的 HeLa 细胞蛋白质,对比分析差异表达蛋白,剖析 TRAIL 作用的机制,为寻求 TRAIL 的作用靶点提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 细胞及主要试剂

人宫颈癌细胞系 HeLa 细胞及 TRAIL 蛋白由重庆医科大学实验动物中心提供,RPMI1640 培养基、胰酶及小牛血清购自北方同正生物技术发展公司,IPG 干胶条(pH 3~10,长 17 cm)、20%(m/V)Pharmalyte(pH 3~10)、碘乙酰胺(iodoacetamide)均购自 Bio-Rad 公司,低分子量蛋白质标准、30% 丙烯酰胺(acryl-

基金项目:国家自然科学基金(30500234)
Supported by the National Natural Science Foundation of China(30500234)

作者简介:赖国旗,女,重庆市人,博士,副研究员,主要从事实验动物学及生物分析化学方面的研究,发表论文 30 余篇。电话:(023)68485044,E-mail: a68895078@21cn.com

通信作者:邱宗荫,电话:(023)68486187

收稿日期:2007-05-16;修回日期:2007-09-11

amide)/甲叉双丙烯酰胺(29∶1)、甘氨酸、三羟甲基氨基甲烷(Tris)、二硫苏糖醇(Dithiothreitol, DTT)、硫脲(Thiourea)、超纯脲(ultra urea)、十二烷基硫酸钠(sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide, SDS)、四甲基乙二胺(TEMED)、丙基硫酸盐(CHAPS)、考马斯亮蓝 R-250 及 G-250、苯甲基磺酰氟(PMSF)、碳酸氢铵、基质(α-氰基-4-羟基肉桂酸,CHCA)、抑肽素、亮肽素均购自 Sigma 公司,胰蛋白酶(测序级)购自 Promega 公司,三氟醋酸购自 Fluka,乙腈(ACN)购自 Fisher 公司,小量柱离心式 RNA 抽提试剂盒、RT-PCR 试剂盒、DNA 分子量标准购自大连宝生物工程(大连)有限公司,引物由上海生工公司合成。

1.2　方法

1.2.1　样品处理　　HeLa 细胞培养于内含 10% 小牛血清的 RPMI1640 培养液中,当细胞生长至单层的 80% 时,实验组去掉培养液,换成含 20 ng/ml TRAIL 的新鲜培养液,对照组给予以同体积的 PBS,37 ℃、5% CO_2 继续培养 24 h。用预冷的 PBS 清洗 3 次,以 0.25% 胰酶消化,收集细胞,用 AO/EB 染色观察实验组细胞是否发生凋亡,并于 20 min 内计数 500 个细胞,计算细胞凋亡率。细胞核呈黄绿色近圆形,细胞结构正常即为正常活细胞(viable non-apoptpticcell,VNA);细胞质被 AO 染成绿色,细胞核呈黄绿色并呈固缩状或圆珠状,即为早期凋亡细胞(viable apoptpticcell, VA);核染色质被 EB 染成橙色或红色,并呈固缩状或圆珠状即为晚期凋亡细胞(non-viable apoptpticcell, NVA);核染色质被 EB 染色呈橙色或红色,结构正常,即为坏死细胞(non-viable non-apoptpticcell, NVNA)。

细胞凋亡率(%) = (VA+NVA)/(VA+NVA+VN+NVN) ×100%

1.2.2　蛋白质样品的制备和双向凝胶电泳　　实验组和对照组样品均按 1×10^6 个细胞加 50 μl 的细胞裂解液[7 mol/L 尿素、2 mol/L 硫脲、1%(质量体积分数)DTT、4%(质量体积分数)CHAPS、2%(体积分数)两性电解质(pH 3~10)和1 mmol/L EDTA、1 mmol/L PMSF、0.7 μg/ml 抑肽素,0.5 μg/ml 亮肽素],刮刀收集。之后,快速冻融 3 ~4 个循环,以 13 000 × g 离心 1 h,取上清,Bradford 法测定蛋白质浓度,按 1.0 mg 分装储存于 -70 ℃保存。取实验组和对照组样品各 1.0 mg,分别加入水化上样液[8 mol/L 尿素,2% CHAPS,65 mmol/L DTT,0.2%(质量体积分数)Bio-Lyte,痕量溴酚蓝],使总体积为500 μl,混匀后加入样品槽(槽中放置有室温平衡后的 IPG 胶条)进行重泡涨,用 IPGphor 等电聚焦仪,在 20 ℃,按如下程序自动进行等电聚焦:① 13 h 重泡涨;② 250 V,30 min;③ 1 000 V,1 h;④ 10 000 V,5 h;⑤10 000 V,6 h;⑥500 V,4 h。等电聚焦结束后的 IPG 胶条放入 5 ml 平衡液(6 mol/L 尿素,2% SDS,1.5 mol/L pH 8.8 Tris-HCl,20% 甘油,2% DTT)中,于摇床上平衡 15 min,再进行另 15 min 平衡(2.5% 碘乙酰胺,6 mol/L 尿素,2% SDS,1.5 mol/L pH 8.8 Tris-HCl,20% 甘油)。然后将平衡后的 IPG 胶条移至 12% 的 SDS-PAGE 凝胶的上方,用 5% 低熔点琼脂糖封闭。凝固后用 Protein Ⅱ XI Cell 电泳系统进行电泳。设置为15 ℃,先按每根胶条 10 mA 电泳 40 min,再按每根胶条 30 mA 恒流电泳至溴酚蓝前沿达玻璃板底部停止。最后,用考马斯亮蓝 R-250 染色。

1.2.3　图像分析　　Amersham ImageMasterVDS-CL 型凝胶成像系统对考马斯亮蓝 R-250 染色的 2-DE 胶进行扫描,获得光密度图像(OD image)。利用 PDQUEST7.4.0(Bio-Rad)图像分析软件对图像进行强度校正、点检测、背景消减、匹配等分析,选取光密度差异两倍以上的斑点为差异蛋白点。

1.2.4　蛋白质质谱分析

1.2.4.1　蛋白质的胶内酶解　　从 2-DE 凝胶上切下差异蛋白斑点,切碎成 1 mm^3 大小装入 EP 管中,水洗 3 次。用 50% ACN-25 mmol/L 碳酸氢铵(pH 8.0)脱色 15 min,反复 3 次,直至颜色脱尽,室温干燥。加 10 ~ 15 μl Trypsin 酶液,静置 30 min,胶块吸胀后,适当补加酶液,37 ℃过夜 16 ~20 h。吸出反应液,加入 50% ACN-5% TFA 混合液 30 ~50 μl,振荡萃取 30 ~60 min,共 2 次,合并萃取液,抽干。加入 3 μl 50% ACN-5% TFA 混合液溶解,ZiptipC18 脱盐后直接用质谱基质液洗脱,进行质谱分析。

1.2.4.2　质谱分析及数据库查询　　制备好的样品用美国 ABI 公司的 Voyager DE-PRO MALDI-TOF 质谱仪分析。外标采用混合的 Mixture 2 标准液进行相邻校正,内标采用胰蛋白酶的自切峰进行两点或单点校正。选择 MS-Fit 数据库(http://prospector.ucsf.edu/)检索。

1.2.5　JNK2 半定量 RT-PCR

1.2.5.1　HeLa 细胞总 RNA 的提取　　HeLa 细胞生长至对数生长期时,实验组分别换上含 TRAIL 10、20、40 ng/ml 的新鲜细胞培养液干预,对照组给予同体积的 PBS,2 组分别培养 24 h,按照 RNA 试剂盒说明书进行总 RNA 提取。

1.2.5.2　分光光度计法检测核酸浓度　　先用 1 ml 蒸馏水校正紫外分光光度计为零。4 μl RNA,加入蒸馏水 1 ml,转入石英杯中测定吸光度 D(260)、D(280)值,计算 D(260)/D(280)为 1.7 ~2.0。

1.2.5.3　RT-PCR 反应　　以提取总 RNA 为模板,用 Oligo 随机引物逆转录反应生成 cDNA。人 JNK2 基因在 GenBank 的序号为 N8008,上、下游引物分别为 5′-CGGAGGTGAGAGTTCCTTCA-3′和 5′-GGAAGAAAGGAGCCAGGAAT-3′;β-actin 基因在 GenBank 的序号为 XM_937148,上、下游引物分别为:5′-ACCGAGTACTTTCGCTCTCG-3′ 和 5′-ACCGAGTACTTTCGCTCTCG-3′。反应条件为:94 ℃预变性 2 min;94 ℃变性 30 s,58 ℃退火 60 s,72 ℃延伸 1 min,30 个循环,最后 72 ℃延伸 10 min,扩增产物的大小分别为 248 bp 和 241 bp。取 10 μl RT-PCR 产物于 1% 琼脂凝胶中电泳,紫外灯照射,凝胶成像扫描仪分析。用 Quantity one 分析软件测定凝胶灰度值。

1.3　统计学方法

IDV 数值用 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用 SPSS 11.0 统计软件进行 t 检验。

2　结果

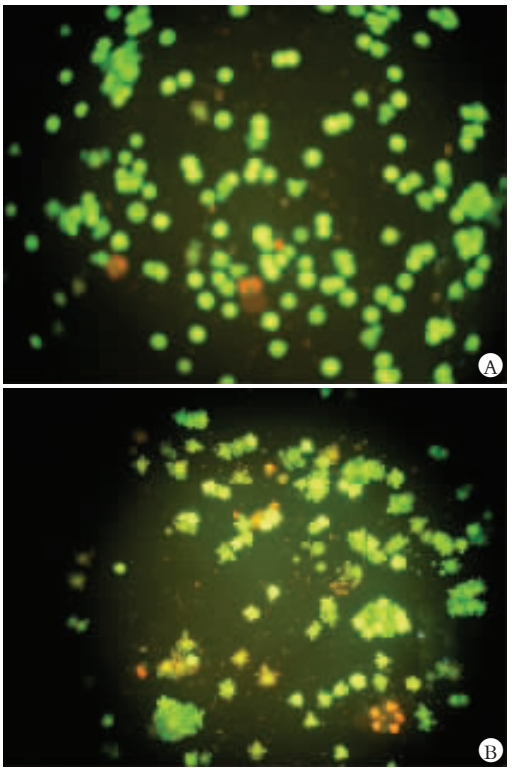
2.1　细胞凋亡的形态学观察

用 20 ng/ml TRAIL 作用于 HeLa 细胞 24 h 后,经 AO/EB 染色,显微镜下可见早期、晚期凋亡细胞,细胞凋亡率为(28 ± 4)%。对照组未见细胞凋亡(图 1)。

2.2　双向电泳及 PDQuest 软件分析

应用 IPG 干胶条对制备型 HeLa 细胞的蛋白质样品进行双向电泳分离,考马斯亮蓝染色,PDQuest 软件分析,可分辨蛋白

点为(920 ±45)。TRAIL 干预与未干预的 HeLa 细胞双向电泳蛋白点匹配率达 89.5%,其中有 8 个蛋白点表达上调,4 个蛋白点表达下调。



A: 对照组; B: 实验组

图 1 2 组 HeLa 细胞 DNA 荧光染色分析 (AO/EB 染色 ×100)

2.3 质谱分析及数据库查询

实验组与对照组的 12 个差异表达蛋白点经质谱分析和 MS-Fit 数据库查询,其结果见表 1、2。

表 1 TRAIL 干预 HeLa 后上调的蛋白点

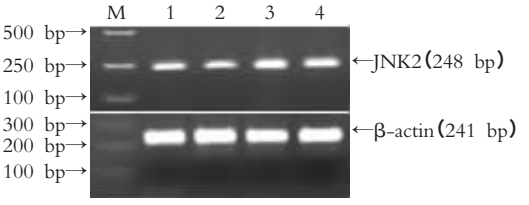
蛋白点	蛋白质分子质量/pI	序列号	蛋白质名称
s1-060227-L	44 288/8.3	P45985	JNKK
s2-060227-L	45 568/8.9	P49137	MAPKAPK-2
s2-060111-L	74 522/4.9	Q8NEU8	Dip13 beta
s3-060111-L	54 813/6.3	P78324	SHPS-1
s4-060111-L	47 864/9.6	Q92466	DNA damage-binding protein 2(DDBb)
s5-060111-L	44 939/8.7	Q9H2G9	JEM-1
s7-060111-L	76 178/9.2	Q8N5G2	Macoilin
s8-060111-L	54 514/6.4	Q15048	Leucine-rich repeat-containing protein 14

表 2 TRAIL 干预 HeLa 后下调的蛋白点

蛋白点	蛋白质分子质量/pI	序列号	蛋白质名称
s3-060227-L	44 620/8.9	Q9UI08	Ena/VASP-like protein
s1-060111-L	67 232/8.1	Q13322	GRB10 adaptor protein
s6-060111-L	68 021/8.2	P43378	PTPase-MEG2
s9-060111-L	39 316/8.0	Q9NXG2	THUMP domain-containing protein 1

2.4 JNK2 半定量 RT-PCR

分光光度法检测提取的总 RNA $D(260)/D(280) = 1.85$。JNK2 基因及 β-actin 基因 RT-PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳,分别在 248、241 bp 处可见一清晰条带(图 2)。JNK2/β-actin 的灰度比值,即为 JNK2 的净密度。经统计学分析,20、40 ng/ml 剂量组[(0.980 ±0.004)、(0.970 ±0.015)]与对照组(0.817 ±0.012)及 10 ng/ml 剂量组(0.817 ±0.036)之间 JNK2 的净密度有显著性差异($P < 0.05$),而 20 ng/ml 和 40 ng/ml 剂量组之间 JNK2 的净密度无显著性差异($P > 0.05$)。表明 20 ng/ml TRAIL 可有效促进 JNK2 基因的表达,JNK2 与 TRAIL 有良好的量效关系。



M:DNA 标准; 1:对照组; 2: 10 ng/ml TRAIL; 3: 20 ng/ml TRAIL; 4: 40 ng/ml TRAIL

图 2 JNK2 cDNA 半定量 RT-PCR 检测结果

3 讨论

TRAIL 是近的来发现的 TNF 家族新成员,具有选择性诱导肿瘤细胞凋亡的作用。为了研究 TRAIL 在一定时空对 HeLa 细胞的功能,本研究比较了被 TRAIL 干预和没有被 TRAIL 干预的 HeLa 细胞的全蛋白2-DE 图谱,经图像分析软件和 MALDI-TOF-MS 分析及 MS-Fit 数据库查询,发现有 12 个差异蛋白,其中有 8 个蛋白质点高表达,有 4 个蛋白质点低表达。

JNKK 的功能是活化 JNK1、JNK2 和 p38。已有研究表明,TRAIL 可通过活化 JNK1 和 JNK2,并通过非 p53 依赖途径抑制细胞存活分数,促进 MG-63、Saos-2 细胞系及间皮瘤(mesothelioma)细胞系、肺癌细胞系等的凋亡。本研究中,JNKK 高表达,并经 RT-PCR 半定量表明,20 ng/ml TRAIL 可有效促进 JNK2 基因的表达,JNK2 与 TRAIL 剂量呈正相关,可推测,TRAIL 可通过 JNKK-JNK2 通路引起 HeLa 细胞凋亡,与以往研究结果一致[3]。

MAPKAPK-2 是 MAPK 家族成员之一的 p38 的下游靶标。有研究发现,TRAIL 诱导卵巢癌细胞凋亡,p38/MAPK 通路起了重要作用[4]。本实验中 MAPKAPK-2 表达上调,表明 TRAIL 对 HeLa 细胞的作用,也通过了 p38/MAPK 通路。

DIP13 蛋白相对分子质量为 12.7×10^3,与人的 NA14 和一种未命名的小鼠蛋白有 60% 的同源性。免疫荧光显色显示,DIP13 存在于 HeLa 细胞核,反义 DIP13 开放读码框,导致细胞累积和增生。另有研究表明 DIP13 与肿瘤抑制因子候选蛋白 DCC(deleted in colorectal cancer)有协同作用,通过 RNAi DIP13 则可

阻断 DCC 诱导的凋亡,如果抑制 DIP13 结合于 DCC 则凋亡作用消失[5]。本研究中,DIP13 的上调是通过何种方式导致 HeLa 细胞凋亡有待进一步研究。

SHPS-1 作为一种新近克隆并被鉴定的属于 Ig 超家族的跨膜糖蛋白,在生物信号转导中具有重要的生物学作用,参与细胞增殖、分化、胚胎发育及神经信息的传递,免疫功能的调节和肿瘤的发生、发展。以往研究发现,增加 NF-κB 可减少 SHPS-1 的表达,最后抑制 TRAIL 对 NIH3T3 细胞系等诱导的凋亡[6]。由此推测,本研究结果中,SHPS-1 上调,即有可能促进 TRAIL 对 HeLa 细胞的凋亡作用。

DDBb 是 DDB 两个亚单位组成之一,具有核酸修复(NER)功能。DDB2 缺乏的小鼠,在 10 ~ 25 月龄时,自发性恶性肿瘤比例增加,表明除了 DNA 修复,DDBb 在肿瘤抑制方面也有作用[7]。本研究表明,DDBb 上调,显示 DDBb 在 TRAIL 对 HeLa 细胞抑制方面有作用。

GEM-1 位于人染色体 1q24,相对分子质量 45 × 10^3,是一种新的核相关因子,能够通过增强 AP-1(activator protein-1)的活性,间接作用于 c-Jun 或者 c-Fos 蛋白,具有核转录活性[7]。

Ena/VASP-like protein 在中枢发育和细胞凋亡中起重要作用。Ena/VASP 基因的失活将造成动物致死的表型[8]。但 TRAIL 与 Ena/VASP 的关系至今少见报道。

GRB10 基因位于 7p11.2-p12,属于接头蛋白家族成员,除能与酪氨酸激酶受体,如 EGF、Erb B2/Her2、PDGF 等血管内源性生长因子受体及 KDR 等结合,也可以与非酪氨酸激酶受体,如 Tec 和 Bcr-Abl、MAP(线粒体活化激酶)结合。研究表明,通过 RNAi GRB10 基因,细胞的生长明显受到抑制。另外,宫颈癌组织原位宫颈癌组织与非癌鳞状上皮细胞相比,GRB10 基因 mRNA 的表达多 50%,GRB10 基因在人宫颈鳞癌上皮细胞的发展起着重要的作用。免疫组化显色表明,GRB10 基因位于癌细胞的细胞质。小鼠实验证明,GRB10 基因的丢失将导致小鼠胚胎及胎儿生长过快。通过 RNAi 的方法抑制过表达胰岛素受体的 HeLa 细胞的内源 GRB10 基因,增加了胰岛素刺激的 MAPK、Shc 和 AKt 的磷酸化,GRB10 基因的功能是负调节胰岛素刺激 MAPK 信号通路[9,10]。本实验 GRB10 下调,提示 TRAIL 可通过抑制 GRB10 的表达,抑制 HeLa 细胞的生长。

PTPase-MEG2 是一种与某些酯结合蛋白 N-末端具有同源性的酶,在红细胞增生症患者体内的细胞中 PTPase-MEG2 的活性增加是由于分布于细胞膜表面的酪氨酸磷酸酯酶的增加所致。目前的研究集中在 PTP-MEG2 被激活的机制及其激活后对红细胞的生长及扩增的影响[11],而 TRAIL 与其作用机制有待研究。

Macoilin (Transmembrane protein 57)、Leucine-rich repeat-containing protein 14 和 THUMP domain- containing protein 1 的功能不是十分清楚。

综上所述,我们通过比较蛋白质组学分析发现了 12 个差异蛋白质。研究结果表明:TRAIL 对 HeLa 细胞的作用是多种基因(及其表达的蛋白),经过多种通路共同作用的结果。12 个差异蛋白质中,有一些差异蛋白的功能与以往研究报道结果相似,而另有一些差异蛋白的功能目前仍不清楚,有待进一步研究。

参考文献:

[1] Kaliberov S A, Buchsbaum D J. Gene delivery and gene therapy of prostate cancer[J]. Expert Opin Drug Deliv, 2006, 3(1): 37 - 51.

[2] 王正兵, 贾筱琴, 陈　兵, 等. TRAIL 真核表达质粒的构建及抑制肝癌生长的实验研究[J]. 中国普外基础与临床杂志, 2005, 12(3): 261 - 264.

[3] Mikami T, Koyama T, Koyama T, *et al*. C-jun N-terminal kinase activation is required for apoptotic cell death induced by TNF-related apoptosis-inducing ligand plus DNA-damaging agents in sarcoma cell lines [J]. Anticancer Res, 2006, 26(2A): 1153 - 1160.

[4] Rousseau S, Dolado I, Beardmore V, *et al*. CXCL12 and C5a trigger cell migration *via* a PAK1/2-p38alpha MAPK-MAPKAP-K2-HSP27 pathway[J]. Cell Signal, 2006, 18(11): 1897 - 1905.

[5] Pfannenschmid F, Wimmer V C, Rios R M, *et al*. Chlamydomonas DIP13 and human NA14: a new class of proteins associated with microtubule structures is involved in cell division[J]. J Cell Sci, 2003, 116(Pt 8): 1449 - 1462.

[6] Neznanov N, Neznanova L, Kondratov R V, *et al*. Dominant negative form of signal-regulatory protein-alpha (SIRPalpha /SHPS-1) inhibits tumor necrosis factor-mediated apoptosis by activation of NF-kappa B [J]. J Biol Chem, 2003 , 278(6): 3809 - 3815.

[7] Zolezzi F, Linn S. Studies of the murine DDB1 and DDB2 genes[J]. Gene, 2000 , 245(1): 151 - 159.

[8] Klostermann A, Lutz B, Gertler F, *et al*. The orthologous human and murine semaphorin 6A-1 proteins (SEMA6A-1/Sema6A-1) bind to the enabled/vasodilator-stimulated phosphoprotein-like protein (EVL) *via* a novel carboxyl-terminal zyxin-like domain[J]. J Biol Chem, 2000, 275(50): 39647 - 39653.

[9] Okino K, Konishi H, Doi D, *et al*. Up-regulation of growth factor receptor-bound protein 10 in cervical squamous cell carcinoma[J]. Oncol Rep, 2005, 13(6): 1069 - 1074.

[10] Langlais P, Dong L Q, Ramos F J, *et al*. Negative regulation of insulin-stimulated mitogen-activated protein kinase signaling by Grb10 [J]. Mol Endocrinol, 2004, 18(2): 350 - 358.

[11] Zhao R, Fu X, Li Q, *et al*. Specific interaction of protein tyrosine phosphatase-MEG2 with phosphatidylserine[J]. J Biol Chem, 2003, 278(25): 22609 - 22614.

(编辑　王　红)