DOI:10.16016/j.1000-5404.201601174

LETM1 在肝癌中的表达及其对 SMMC-7721 细胞增殖和凋亡的影响

周宝勇,蒋 宁,廖 锐,郑 军,杜成友 (400016 重庆,重庆医科大学附属第一医院肝胆外科)

[摘要] **目的** 探讨亮氨酸拉链 EF-hand 结构域跨膜蛋白 1(leucine bnzipper/EF-hand-containing transmembrane protein1,LETM1)在肝癌组织中的表达水平及通过 RNAi 技术靶向 LETM1 基因对肝癌细胞株 SMMC-7721 的增殖及凋亡的影响。**方法** 采用免疫组织化学方法、Western blot 检测重庆医科大学附属第一医院肝胆外科 2012 年 9 月至 2013 年 4 月共 60 例肝癌组织及其癌旁肝组织中 LETM1 蛋白表达情况。Western blot 检测人肝癌细胞株 SMMC-7721 和 HepG2 及人正常肝细胞株 LO2 中的 LETM1 蛋白表达情况。将 LETM1 siRNA 经 Lipofectamine 2000™脂质体转染 SMMC-7721(实验组为 si-LETM1、对照组为 si-NC),实时荧光定量 PCR 及 Western blot 分别检测 LETM1 转染后肝癌 SMMC-7721 细胞株中 LETM1 mRNA 及蛋白的表达。CKK-8 及流式细胞术检测 LETM1 低表达对肝癌细胞增殖及细胞凋亡的影响。**结果** ①免疫组织化学结果显示,LETM1 蛋白在肝癌组织中的阳性表达率为 73.33%(44/60),明显高于癌旁组织中的表达率 28.33%(17/60,$P<0.01$);Western blot 检测结果显示,LETM1 蛋白在肝癌组织中的表达相对量(2.335±0.221)较癌旁组织(1.386±0.081)明显增高($P<0.01$)。②LETM1蛋白表达与肝癌肿瘤直径及门静脉侵犯有关($P<0.05$),而与肝癌患者性别、年龄、甲胎蛋白、HBsAg、Edmondson 分级及 TNM 分期无关($P>0.05$)。③LETM1 蛋白在 SMMC-7721 及 HepG2 中的表达相对量[(分别为(1.447±0.149)、(1.190±0.113)]均明显高于 LO2[(0.918±0.027),$P<0.05$]。④si-LETM1 组与 si-NC 组和空白组比较,si-LETM1 组细胞的增殖受到抑制($P<0.01$),尤以 72 h 及 96 h 最为显著;si-LETM1 早期细胞凋亡数(14.6±2.3)%与 si-NC 早期细胞的凋亡数(6.3±0.7)%比较,差异有统计学意义($P=0.04$)。**结论** LETM1 蛋白在肝癌组织的表达显著高于癌旁组织;基因沉默 LETM1 后的肝癌细胞其增殖能力明显减弱,凋亡能力明显增强。

[关键词] 肝细胞癌;RNA 干扰;LETM1;细胞增殖;凋亡
[中图法分类号] R394.3;R730.23;R735.7 [文献标志码] A

Expression of LETM1 in hepatocellular carcinoma and its effect on proliferation and apoptosis in hepatocellular carcinoma cell line SMMC-7721

Zhou Baoyong, Jiang Ning, Liao Rui, Zheng Jun, Du Chengyou (Department of Hepatobiliary Surgery, the First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing, 400016, China)

[**Abstract**] **Objective** To analyze the expression of leucine zipper/EF-hand-containing transmembrane protein 1 (LETM1) in the human hepatocellular carcinoma (HCC) and to determine the effect of RNA interference targeted to silence LETM1 gene on the proliferation and apoptosis of HCC cell line SMMC-7721. **Methods** Immunohistochemical assay and Western blotting were used to analyze the expression level of LETM1 protein in HCC tissues and paraneoplastic tissues from 60 HCC patients who admitted in our department from September 2012 to April 2013. The relationship between LETM1 expression and clinical pathological parameters was studied. Western blotting was also used to analyze the expression of LETM1

[基金项目] 国家自然科学基金青年科学基金项目(81301656);国家临床重点专科建设资助项目([2012]649 号);重庆市渝中区科技计划项目(20140109)
[通信作者] 杜成友,E-mail:duchengyou@126.com
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20160620.1016.001.html(2016-06-20)

protein in SMMC-7721, HepG2 and normal liver LO2 cells. RNA interference targeted to silence LETM gene was transfected into the SMMC-7721 cells with Lipofectamine 2000 (representing the control group si-NC and the experimental group si-LETM1). Quantitative real-time PCR (qRT-PCR) and Western blotting were used to detect the mRNA and protein levels of LETM1 in the silenced cells. The proliferation and apoptosis of the transfected cells were assessed by CCK-8 assay and flow cytometry. **Results** Immunohistochemical assay indicated that LETM1 protein was expressed in 73.33% HCC tissues(44/60), significantly higher than that of paraneoplastic tissues (28.33%, 17/60, $P<0.01$). The results showed that the expression at protein level was also higher in the HCC tissues than the paraneoplastic tissues (2.335 ± 0.220 *vs* 1.386 ± 0.080, $P<0.01$). The expression of LETM1 protein was correlated with tumor size and portal vein invasion ($P<0.05$), but not with gender, age, alpha fetoprotein, HBsAg, Edmondson grade and TNM stage ($P>0.05$). The expression level of LETM1 protein was significantly higher in the SMMC-7721 (1.447 ± 0.149) and HepG2 cells (1.190 ± 0.113) than the LO2 cells (0.918 ± 0.027, $P<0.05$). Compared with si-NC group and blank group, the cell proliferation was inhibited significantly in si-LETM1 treated cells ($P<0.01$), especially at 72 and 96 h. The early apoptosis of si-LETM1 transfected cells had a significant increase when compared with si-NC treated cells [$(14.6\pm2.3)\%$ *vs* $(6.3\pm0.7)\%$, $P=0.04$]. **Conclusion** The protein expression of LETM1 is significantly higher in HCC tissues than the paraneoplastic tissues. RNAi of LETM1 may inhibit cells proliferation and induce apoptosis in the SMMC-7721 cells.

[**Key words**] human hepatocellular carcinoma; RNAi; leucine zipper/EF-hand-containing transmembrane protein 1; cell proliferation; apoptosis

Supported by the National Natural Science Foundation for Young Scholars of China (81301656), the National Clinical Key-descipline Construction Program of China (2012-649) and the Science and Technology Project of Yuzhong District of Chongqing (20140109). Corresponding author: Du Chengyou, E-mail: duchengyou@126.com

肝癌是一种常见的恶性肿瘤,其恶性程度极高,我国是世界上肝癌发病集中的国家,每年新发病例及死亡病例约占全球的50%[1]。现有的治疗方法主要以肝切除及肝移植为主,然而术后肿瘤复发率高,预后不容乐观。亮氨酸拉链EF-hand结构域跨膜蛋白1(leucine zipper/EF-hand-containing transmembrane protein1,LETM1)是最新发现的线粒体蛋白,报道指出其能诱发Wolf-Hirschhorn综合征[2]。Piao等[3]发现,LETM1在宫颈癌中高表达,可激活PI3K-Akt信号传导通路从而影响宫颈癌的发生、发展;同时研究报道LETM1蛋白在结肠癌组织中高表达[4]。LETM1可能在肝癌的发生、发展过程中也发挥着一定的作用。本研究采用免疫组织化学方法、Western blot检测LETM1在肝癌组织的表达情况及其与临床参数的关系,并应用RNA干扰(RNA interference,RNAi)技术靶向沉默肝癌细胞SMMC-7721中的LETM1基因,使细胞中LETM1蛋白表达减少,观察其对细胞增殖和凋亡的影响,以期为肝癌治疗提供新方向和新的治疗策略。

1 材料与方法

1.1 标本来源

60例取自重庆医科大学附属第一医院肝胆外科2012年9月至2013年4月手术切除并经病理确诊的肝细胞癌及其相应癌旁组织标本(距癌组织边缘>3 cm),所取组织部分用4%多聚甲醛固定,部分存于液氮中。患者术前均未行放疗、化疗及免疫抑制等治疗。其中男性47例,女性13例。年龄18~79岁,中位年龄57岁。肿瘤直径0.8~16 cm,肿瘤最大1例,最小1例,肿瘤直径>5 cm有40例,≤5 cm有20例;Edmondson标本分级:Ⅰ~Ⅱ级26例,Ⅲ~Ⅳ级34例。所选标本均进行术前谈话,并获得患者或其家属同意。

人肝癌细胞株SMMC-7721、HepG2及人正常肝细胞株LO2由重庆医科大学附属第一医院实验研究中心惠赠。

1.2 主要试剂

兔抗人LETM1多克隆抗体、兔抗人GAPDH多克隆抗体、HRP标记羊抗兔二抗(Proteintech公司);免疫组织化学法(S-P)试剂盒、DAB显色试剂盒(北京中杉金桥生物技术公司);Lipofectamine™ 2000(美国Invitrogen公司);si-RNA(Origene公司);全蛋白提取试剂、BCA试剂盒、ECL发光试剂盒、RNA TRIzol提取试剂盒、TRIzol提取试剂、逆转录和PCR试剂盒、CCK-8试剂盒、Annexin V-FITC细胞凋亡检测试剂盒等(碧云

天生物技术公司);LETM1 和 GAPDH 引物由上海生工生物工程有限公司合成;其余实验材料及试剂取自重庆医科大学附属第一医院实验研究中心。

1.3 免疫组织化学法

4%多聚甲醛溶液固定的标本行常规石蜡包埋,制成4 μm 厚切片。参照免疫组化试剂盒说明书操作:切片经二甲苯脱蜡水化后,枸橼酸微波高温修复抗原,3%过氧化氢 10 min 阻断内源性过氧化物酶,血清 37 ℃ 封闭 20 min,LETM1 抗体(1∶50)4 ℃孵育过夜,二抗孵育后加入辣根酶标记链霉卵白素工作液孵育 20 min,DAB 显色,苏木精复染,常规脱水,封片。用 PBS 代替 LETM1 抗体作为空白对照。

1.4 结果判定

在排除非特异性染色的前提下,LETM1 在细胞质内以黄色、棕黄色、棕褐色为阳性。计分方法 A:按切片中细胞染色的深浅评分,0 分为无染色,1 分为浅黄色,2 分为棕黄色,3 分为棕褐色;B:按切片中的阳性细胞比例评分,每个标本计数 3 张切片,每张切片随机选择 5 个视野,每个视野 100 个细胞,计数 500 个细胞中染色阳性的细胞数,0 分为染色细胞数≤5%,1 分为染色细胞数占 >5% ~25%,2 分为染色细胞数占 >25% ~50%,3 分为染色细胞数占 >50% ~75%,4 分为染色细胞数 >75%。每例标本染色积分 = A × B,若乘积≤1 为阴性,>1 为阳性。

1.5 Western blot 检测

提取肝癌组织、癌旁组织及 LO2、SMMC-7721、HepG2 细胞株的总蛋白。4 ℃,12 000 r/min,离心 20 min(r = 10 cm),取上清,-20 ℃保存备用。BCA 蛋白定量试剂盒检测蛋白浓度,按每孔上样量 50 μg 进行 SDS-PAGE 电泳,恒流冰浴电转至 PVDF 膜上,5% 脱脂牛奶封闭 2 h,一抗孵育 4 ℃ 过夜(LETM1 1∶500,GAPDH 1∶1 000),HRP 标记羊抗兔二抗(1∶2 000),ECL 显色,暗室曝光显影,GAPDH 为内参,实验重复 3 次。

LETM1 蛋白表达抑制率计算:抑制率(%)=[1-(si-LETM1 组 LETM1 条带灰度/si-LETM1 组 GAPDH 条带灰度)/(si-NC 组 LETM1 条带灰度/si-NC 组 GAPDH 条带灰度)]

1.6 细胞培养及细胞转染

将人肝癌细胞 SMMC-7721 细胞接种于含 10%胎牛血清的 DMEM 培养基中,于 5% CO_2、37 ℃恒温培养箱中培养。转染前 24 h 按 3×10^5/孔接种于 6 孔板,加入无血清的培养基 2 mL,使转染时细胞密度约为 40%。将 siRNA Lipofectamine™2000 复合体(复合体的配置按照说明书操作)加到 6 孔板中,转染体系为 500 μL,siRNA 终浓度为 50 nmol/L,其中实验组为 si-LETM1 组,阴性对照组为无义 siRNA 表达载体的转染,即 si-NC 组,空白组孔内加入相同密度的未转染的 SMMC-7721 细胞。

1.7 实时荧光定量 PCR

按 TRIzol 和反转录试剂说明书要求提取 si-NC 细胞、si-LETM1 细胞中总 RNA,反转录成 cDNA,以cDNA 为模板行 PCR 扩增。LETM1 基因上游引物为 5′-CCCAAGCTTATGGCGTCCATCTTACTGAGG-3′,下游引物为 5′-CCGCTCGAGTCACTAGCTCTTCACCTCTGCG-3′[5];GAPDH 为内参,上游引物为 5′-AGAAGGCTGGGGCTCATTTG-3′,下游引物为 5′-AGGGGCCATCCACAGTCTTC-3′。反应体系 20 μL,包括 cDNA 模板 1 μL,上下游引物各 0.5 μL,2 × PCR mixture 10 μL,DEPC 水 8 μL,PCR 反应条件:95 ℃预变性 5 min;95 ℃变性 30 s,55 ℃ 退火 30 s,72 ℃ 延伸 60 s,35 个循环。每孔设计 2 个复孔。采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 分析法,按照公式分别计算实验组、对照组及空白组的 ΔCt,以空白组的 ΔCt 为参照,计算 $2^{-\Delta\Delta Ct}$,即为 LETM1 mRNA 相对表达量。

$$\Delta Ct = Ct_{实验组} - Ct_{对照组}$$

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{靶基因} - \Delta Ct_{内参基因}$$

1.8 CCK-8 实验

将指数生长期的 si-NC 细胞、si-LETM1 细胞接种于 96 孔板内,按接种密度 70% ~80%,每孔 5 000 个/200 μL,设 6 个复孔,空白孔为未转染的 SMMC-7721 细胞。分别于 24、48、72 h 和 96 h 分别终止培养。终止培养前 4 h,每孔中加入 CCK-8 溶液 20 μL,放置培养箱中孵育 4 h,选择 450 nm 波长,在酶标仪上测定各孔光密度值[D(450)],记录结果,绘制生长曲线。

1.9 细胞凋亡实验

取接种密度 70% ~80% 的转染细胞,消化、收集细胞,用 4 ℃预冷的 PBS 洗细胞 2 次,以 1 mL 结合缓冲液重悬细胞,调整细胞浓度为 1×10^5/mL,用 Annexin V 和碘化丙啶(PI)双染 15 min 后用流式细胞术检测细胞凋亡率。

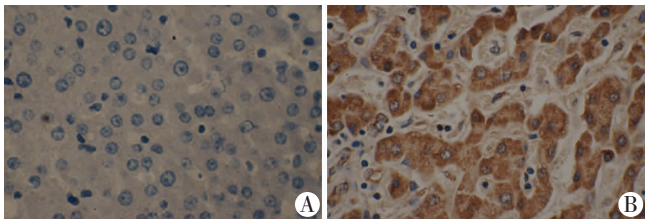
1.10 统计学方法

采用 SPSS 22.0 进行统计学分析,定量资料用 $\bar{x} \pm s$ 进行描述,用 t 检验进行均值差异的比较;临床病理特征的数据采用 χ^2 检验及校正的 χ^2 检验。检验水准 $\alpha = 0.05$。

2 结果

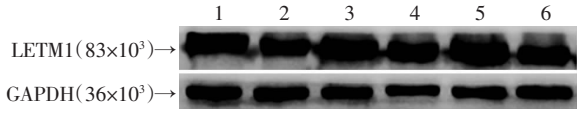
2.1 肝癌组织中 LETM1 的表达

HE 染色及免疫组织化学结果显示,LETM1 主要定位于细胞质,阳性表达主要染成黄色、棕黄色或棕褐色(图 1)。LETM1 在肝癌组织和癌旁组织的阳性表达率分别为 73.33%(44/60)及 28.33%(17/60),差异有统计学意义($\chi^2 = 24.307$, $P < 0.01$)。Western blot 检测结果如图 2 所示,LETM1 在肝癌组织的表达量为(2.335 ± 0.221),明显高于癌旁组织的相对表达量[(1.386 ± 0.081), $t = 16.579$, $P < 0.01$]。



A:癌旁组织;B:癌组织

图 1 LETM1 在肝癌组织及癌旁肝组织中的表达 (S-P ×400)



1、3、5:癌组织;2、4、6:癌旁组织

图 2 Western blot 检测 LETM1 在肝癌组织及癌旁组织中的表达

2.2 LETM1 与肝癌临床参数的关系

LETM1 蛋白与肝癌肿瘤直径及门静脉侵犯有关,($P < 0.05$),而与肝癌患者性别、年龄、甲胎蛋白、HBsAg、Edmondson 分级及 TNM 分期无关($P > 0.05$,表 1)。

2.3 LO2、HepG2 及 SMMC-7721 细胞株中 LETM1 的表达

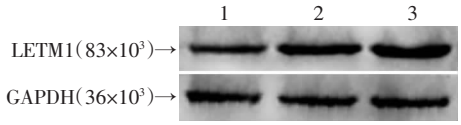
Western blot 检测结果显示,LETM1 蛋白在人肝癌细胞株 SMMC-7721 及 HepG2 中的表达相对量[分别为(1.447 ± 0.149)、(1.190 ± 0.113)]均明显高于人正常肝细胞株 LO2[(0.918 ± 0.027), $P < 0.05$],而 SMMC-7721 与 HepG2 相比两者差异无统计学意义($t = 1.976$, $P = 0.187$,图 3)。

2.4 RNAi 沉默 SMMC-7721 中 LETM1 的鉴定

RT-PCR 检测结果显示,对照组 LETM1 的 Ct 值为(21.787 ± 0.059),GAPDH 的 Ct 值为(11.110 ± 0.095),实验组 LETM1 的 Ct 值为(24.880 ± 0.217),GAPDH 的 Ct 值为(11.913 ± 0.304);LETM1 mRNA 在 si-NC 细胞中的相对表达量为 1、在 si-LETM1 细胞中的相对表达量为(0.214 ± 0.079),2 组细胞之间差异有统计学意义($t = 17.147$, $P = 0.003$)。

表 1 LETM1 表达与肝癌临床参数的关系

组别	例数	LETM1 蛋白的表达		χ^2 值	P 值
		阴性	阳性		
组织部位					
癌	60	16	44	24.307	<0.01
癌旁	60	43	17		
性别					
男	47	13	34	0.109	0.741
女	13	3	10		
年龄(岁)					
≤50	27	7	20	0.014	0.907
>50	33	9	24		
肿瘤直径(cm)					
≤5	20	9	11	5.156	0.023
>5	40	7	33		
甲胎蛋白(ng/mL)					
≤400	43	12	31	0.119	0.730
>400	17	4	13		
HBsAg					
阳性	48	12	36	0.341	0.559
阴性	12	4	8		
门静脉侵犯					
有	15	1	14	4.091	0.043
无	45	15	30		
TNM 分期(AJCC)					
Ⅰ~Ⅱ	19	5	14	0.002	0.967
Ⅲ~Ⅳ	41	11	30		
Edmondson 分级					
Ⅰ~Ⅱ	26	8	18	0.395	0.530
Ⅲ~Ⅳ	34	8	26		

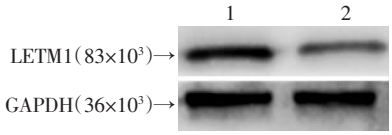


1: LO2; 2: HepG2; 3: SMMC-7721

图 3 Western blot 检测 LETM1 在 LO2、HepG2 及 SMMC-7721 中的表达

Western blot 检测结果显示,LETM1 蛋白在 si-NC 细胞、si-LETM1 细胞中的相对表达量分别为(0.377 ± 0.013)、(0.180 ± 0.016),两组细胞比较差异有统计

学意义(t = 14.208, P = 0.005, 图 4)。si-LETM1 组 LETM1 蛋白表达抑制率约为 52.2%。

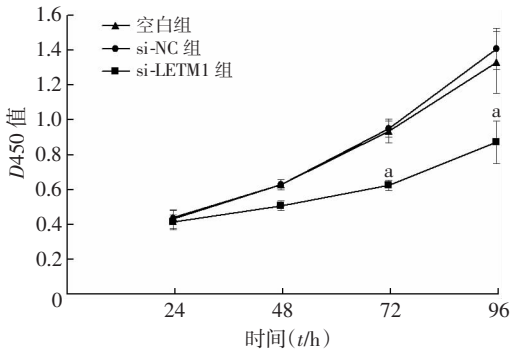


1: si-NC 组; 2: si-LETM1 组

图 4 Western blot 检测转染细胞中 LETM1 蛋白的表达

2.5 对转染后 SMMC-7721 细胞增殖的影响

根据 CCK-8 检测结果绘制的生长曲线,结果显示 si-LETM1 组较 si-NC 组和空白组曲线降低,尤其在 72、96 h 时,差异有统计学意义(P <0.01,图 5)。

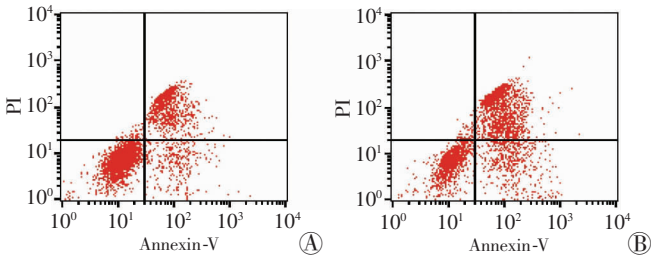


a: P <0.01,与空白组、si-NC 组比较

图 5 CCK-8 检测 LETM1 转染对 SMMC-77721 细胞增殖的影响

2.6 对转染后 SMMC-7721 细胞凋亡的影响

流式细胞术检测结果显示,si-LETM1 组早期细胞凋亡数为(14.6 ± 2.3)%,si-NC 组早期细胞的凋亡数为(6.3 ± 0.7)%,差异有统计学意义(t = 4.871, P = 0.04,图 6)。



A: si-NC 组; B: si-LETM1 组

图 6 流式细胞术检测 LETM1 转染对 SMMC-7721 细胞凋亡的影响

3 讨论

LETM1 是一种线粒体内膜结合蛋白,其中包含 2 个 EF-手,一个跨膜结构域,一个亮氨酸拉链和几个卷曲螺旋结构域,最先发现为 Wolf-Hirschhorn 综合征患者中的染色体上缺失的基因之一[2-3]。Wolf-Hirschhorn 综合征是由 4 号染色体短臂末端片段缺失引起的一种染色体疾病,主要临床表现为特殊面容、生长迟缓、智力低下、癫痫和多发畸形[6]。LETM1 是线粒体和核糖体之间形成的络合物的一种锚固蛋白,编码人类同源酵母线粒体形态相关的 Mdm38 蛋白,Mdm38/LETM1 的缺乏可减少线粒体编码稳态水平的蛋白质,降低呼吸链中细胞色素 b 和 ATP 的插入,影响呼吸链的生物合成[7-8]。LETM1 可以调节线粒体的生物合成和翻译系统,并参与细胞中 Ca^{2+} 及 K^+ 的运输[9]。随后又有研究表明,LETM1 蛋白在肿瘤细胞浆中通过糖酵解产生能量,LETM1 蛋白高表达诱导线粒体功能障碍,导致糖酵解的增加,使 ATP 增加,进而影响 NADH/NADPH 的比值,活化人第 10 号染色体缺失的磷酸酶(phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10, PTEN),进一步激活 PI3K/Akt 信号转导通路,使 Akt 持续的活化,从而参与细胞生长凋亡及肿瘤细胞侵袭[10-11]。Lee 等[12]通过质谱分析发现 MATR3、LETM1、ILF2 及 IQGAP2 等可能是 HCC 的潜在的分子靶点。

本研究结果显示,LETM1 蛋白在肝癌组织中的表达水平显著高于癌旁组织。这与 Piao 等[3]发现 LETM1 蛋白在宫颈癌中高表达及高爱花等[4]指出 LETM1 蛋白在结肠癌组织中高表达是一致的。LETM1 蛋白在 SMMC-7721 及 HepG2 中的表达相对量均明显高于 LO2(P <0.05)。LETM1 不仅在宫颈癌、结肠癌、三阴性乳腺癌[13]、头颈部鳞状细胞癌[14]等肿瘤中高表达,本研究结果显示 LETM1 在肝癌组织也呈高表达。我们进而分析了 LETM1 蛋白与临床参数的相关性,结果显示 LETM1 蛋白表达与肝癌肿瘤直径及门静脉侵犯有关,而与肝癌患者性别、年龄、甲胎蛋白、HBsAg、Edmondson 分级及 T 分期无关。这表明 LETM1 可能参与了肝癌细胞的增殖与侵袭转移。

在体外研究中进一步对 SMMC-7721 中的 LETM1 基因进行沉默,观察其对肝癌细胞株的增殖及凋亡的影响。CCK-8 实验中 si-LETM1 组较 si-NC 组和空白组曲线明显降低(P <0.01),说明 LETM1 低表达的肝癌细胞增殖能力明显减弱。流式细胞术检测结果显示,si-NC 组早期细胞的凋亡数(6.3 ± 0.7)%,与 si-LETM1 组早期细胞凋亡数(14.6 ± 2.3)% 比较,差异

有统计学意义($P<0.01$),说明沉默 LETM1 的肝癌细胞凋亡明显增多。

综上所述,本研究表明,LETM1 蛋白在肝癌病程进展中可能发挥了一定的作用,但 LETM1 在肝癌发生、发展中的具体作用机制有待进一步研究。

参考文献:

[1] Torre L A, Bray F, Siegel R L, *et al*. Global cancer statistics, 2012[J]. CA Cancer J Clin, 2015, 65(2): 870108. DOI: 10.3322/caac.21262

[2] Nowikovsky K, Froschauer E M, Zsurka G, *et al*. The LETM1/YOL027 gene family encodes a factor of the mitochondrial K^+ homeostasis with a potential role in the Wolf-Hirschhorn syndrome[J]. J Biol Chem, 2004, 279(29): 30307-30315. DOI: 10.1074/jbc.M403607200

[3] Piao L, Li Y, Kim S J, *et al*. Association of LETM1 and MRPL36 contributes to the regulation of mitochondrial ATP production and necrotic cell death[J]. Cancer Res, 2009, 69(8): 3397-3404. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-08-3235

[4] 高爱花, 金永民, 孙红花, 等. LETM1 蛋白在结肠癌组织中的表达及临床意义[J]. 世界华人消化杂志, 2014, 22(5): 718-723. DOI: 10.11569/wcjd.v22.i5.718

[5] 金艳花, 郑善子, 姜昌镐. LETM1 基因真核表达载体的构建[J]. 延边大学医学学报, 2013, 36(4): 247-249. DOI: 10.16068/j.1000-1824.2013.04.011

[6] Misceo D, Baroy T, Helle J R, *et al*. 1.5Mb deletion of chromosome 4p16.3 associated with postnatal growth delay, psychomotor impairment, epilepsy, impulsive behavior and asynchronous skeletal development[J]. Gene, 2012, 507(1): 85-91. DOI: 10.1016/j.gene.2012.07.021

[7] Bauerschmitt H, Mick D U, Deckers M, *et al*. Ribosome-binding proteins Mdm38 and Mba1 display overlapping functions for regulation of mitochondrial translation[J]. Mol Biol Cell, 2010, 21(12): 1937-1944. DOI: 10.1091/mbc.E10-02-0101

[8] Nowikovsky K, Pozzan T, Rizzuto R, *et al*. Perspectives on: SGP symposium on mitochondrial physiology and medicine: the pathophysiology of LETM1[J]. J Gen Physiol, 2012, 139(6): 445-454. DOI: 10.1085/jgp.201110757

[9] Hashimi H, McDonald L, Stribrna E, *et al*. Trypanosome Letm1 protein is essential for mitochondrial potassium homeostasis[J]. J Biol Chem, 2013, 288(37): 26914-26925. DOI: 10.1074/jbc.M113.495119

[10] Li T, Wang G. Computer-aided targeting of the PI3K/Akt/mTOR pathway: toxicity reduction and therapeutic opportunities[J]. Int J Mol Sci, 2014, 15(10): 18856-18891. DOI: 10.3390/ijms151018856

[11] Cheng G Z, Park S, Shu S, *et al*. Advances of AKT pathway in human oncogenesis and as a target for anti-cancer drug discovery[J]. Curr Cancer Drug Targets, 2008, 8(1): 2-6. DOI: 10.2174/156800908783497159

[12] Lee Y Y, McKinney K Q, Ghosh S, *et al*. Subcellular tissue proteomics of hepatocellular carcinoma for molecular signature discovery[J]. J Proteome Res, 2011, 10(11): 5070-5083. DOI: 10.1021/pr2005204

[13] Wang C A, Liu Q, Chen Y, *et al*. Clinical implication of leucine zipper/EF hand-containing transmembrane-1 overexpression in the prognosis of triple-negative breast cancer[J]. Exp Mol Pathol, 2015, 98(2): 254-259. DOI: 10.1016/j.yexmp.2014.12.012

[14] Chen L, Yang Y, Liu S, *et al*. High expression of leucine zipper-EF-hand containing transmembrane protein 1 predicts poor prognosis in head and neck squamous cell carcinoma[J]. Biomed Res Int, 2014, 2014: 850316. DOI: 10.1155/2014/850316.

(**收稿**:2016-01-31;**修回**:2016-05-23)

(编辑 邓强庭)