DOI:10.16016/j.1000-5404.201907114

过表达 ATAD3A 诱导大鼠正常肝干细胞发生上皮-间质转化

冯亚星[1,2],周龙甫[2],王一涵[1],古 瑞[2],李 薇[2],张耀雷[2],李 婷[2],刘卫辉[1] 610003 成都,西南交通大学医学院[1];610083 成都,中国人民解放军西部战区总医院中心实验室[2]

[摘要] **目的** 探讨过表达 ATP 酶家族 AAA 结构域蛋白(ATPase family AAA domain protein, ATAD3A)后对大鼠肝脏干细胞上皮-间质转化(epithelial-to-mesenchymal transition,EMT)、迁移和侵袭能力的影响。**方法** 体外培养大鼠肝干细胞系(WBF-344),分别转染含过表达 ATAD3A 基因的慢病毒(ATAD3A 过表达组)和不含过表达 ATAD3A 基因的载体(空载对照组),以不做处理的细胞作为正常对照组。显微镜下观察细胞形态变化,细胞划痕和 Transwell 实验检测各组细胞的迁移和侵袭能力,RT-qPCR 法和 Western blot 法检测 EMT 标志物和转录因子的基因和蛋白表达水平,体外裸鼠皮下成瘤实验验证肝干细胞恶性转化程度。**结果** 与 2 个对照组比较,ATAD3A 过表达组:①细胞由卵圆形向长条形和梭形的间质细胞形态特征转变;②细胞迁移和侵袭能力得到明显增强($P<0.05$);③E-cadherin 的基因和蛋白表达明显降低,而 N-cadherin 的基因和蛋白表达明显升高($P<0.05$);④转录因子 ZEB1 和 ZEB2 的表达也显著增加($P<0.05$)。但体外成瘤实验未能观察到肿瘤块的形成。**结论** 过表达 ATAD3A 后能诱导大鼠肝干细胞 EMT 的发生。

[关键词] ATP 酶家族 AAA 结构域蛋白;肝干细胞;上皮-间质转化;侵袭;迁移
[中图法分类号] R394.3; R730.23; R735.7 [文献标志码] A

Overexpression of ATPase family AAA domain containing protein 3A induces epithelial-to-mesenchymal transition of normal rat liver stem cells *in vitro*

FENG Yaxing[1,2], ZHOU Longfu[2], WANG Yihan[1], GU Rui[2], LI Wei[2], ZHANG Yaolei[2], LI Ting[2], LIU Weihui[1]
[1]Southwest Jiaotong University College of Medicine, Chengdu, Sichuan Province, 610003; [2]Central Laboratory, General Hospital of Western Theater Command, Chengdu, Sichuan Province, 610083, China

[**Abstract**] **Objective** To investigate the effect of overexpression of ATPase family AAA domain protein 3A (ATAD3A) on epithelial-to-mesenchymal transition (EMT), migration and invasion of rat liver stem cells. **Methods** Cultured rat liver stem cell line (WBF-344) was transfected with a lentivirus vector carrying ATAD3A to construct a stable ATAD3A-overexpressing cell line. The morphological changes of the transfected cells were observed microscopically, and the migration and invasion ability of the cells were assessed using cell scratch and Transwell assays. The expression of the EMT markers and transcription factors at the mRNA and protein levels was detected using RT-qPCR and Western blotting. The malignant transformation of the transfected cells was evaluated by assessing their subcutaneous tumorigenic ability in nude mice. **Results** Compared with the cells transfected with the blank lentiviral vector, the cells overexpressing ATAD3A showed obvious morphological transformation from an oval to an elongated and spindle-shaped morphology and exhibited significantly enhanced migration and invasion abilities. ATAD3A overexpression in WBF-344 cells significantly decreased the expression of E-cadherin and increased the expression of N-cadherin at both the mRNA and protein levels, causing also significant enhancement of ZEB1 and ZEB2 expression. In the *in vivo* experiment, subcutaneous implantation of the transfected cells did not result in tumor formation in

[基金项目] 四川省科技厅应用基础重点项目(2019YJ0586)
[通信作者] 刘卫辉,E-mail:audiliu12@163.com

nude mice. **Conclusion** Overexpression of ATAD3A can induce EMT in normal rat liver stem cells.

[**Key words**] ATPase family AAA domain protein; normal rat liver stem cells; epithelial-to-mesenchymal transition; invasion, migration

Supported by the Key Applied Science Research Project of Sichuan Provincial Department of Science and Technology (2019YJ0586). Corresponding author: LIU Weihui, E-mail: audiliu12@163.com

肝细胞癌(hepatocellular carcinoma,HCC)是严重影响我国人民健康的一种重大疾病,每年全球超过一半的新发病例都发生在中国[1]。由于缺乏有效的早期诊断和药物治疗措施,其死亡率非常高[2]。其原因是肝癌发现晚,易复发及易转移的调控机制尚不清楚。因此,揭示肝癌发生发展的机制,同时寻找肝癌的早期诊断标记具有重要的意义。

上皮-间质转化(epithelial-to-mesenchymal transition,EMT)和肿瘤干细胞(cancer stem cells,CSCs)都被认为与肿瘤恶性的进展有关,然而 EMT 和 CSCs 之间关系尚不清楚。综合国内外文献,正常肝干细胞(liver normal stem cells,LNSCs)恶性转化是肝癌干细胞(liver cancer stem cells,LCSCs)的重要来源之一的学说越来越得到认可[3-6]。有学者推测肝癌发生的过程可能就是 LNSCs 反复发生 EMT,最后转变成 LCSCs[7]。

ATP 酶家族 AAA 结构域蛋白(ATPase family AAA domain protein,ATAD3A)是一种核编码的干细胞线粒体膜蛋白,涉及线粒体动力学、蛋白质翻译、细胞生长和胆固醇代谢[8-9]。近来研究发现,其在肺癌、胶质瘤、乳腺癌中存在异常表达,并与肿瘤的耐药及增殖密切相关[10-14],同时还发现其对几种有机体的发育至关重要[15-17]。然而,目前研究者对 ATAD3A 在 LNSCs 和 HCC 中的生物学功能和调节机制中的作用还不是很清楚。因此,本研究旨在探讨过表达 ATAD3A 基因对大鼠 LNSCs 系(WBF-344)发生 EMT 过程的调控作用,分析过表达 ATAD3A 基因对 WBF-344 细胞恶性转化的影响,以揭示 ATAD3A 促进 LNSCs 发生 EMT 转化的相关机制。这些将有助于为 LCSCs 起源学说提供理论支持,为肝癌的早期诊断提供潜在的分子标记,同时为 LNSCs 治疗 HCC 提供理论指导。

1 材料与方法

1.1 材料

大鼠上皮样肝干细胞——WBF-344 细胞株购于商城北纳创联生物科技有限公司;胎牛血清(FBS)和 DMEM 高糖培养基购自 Gibco 公司;anti-ATAD3A 抗体、anti-N-cadherin 抗体、anti-E-cadherin 抗体购自 Abcam 公司;过表达 ATAD3A 慢病毒购自上海吉凯基因;所有引物由擎科生物合成,引物序列见表 1。胰酶-EDTA 购自北京索莱宝科技有限公司;SPF 级裸鼠购于四川达硕生物科技公司;反转录试剂盒及 RT-qPCR 试剂购自大连宝生物科技公司。

1.2 方法

1.2.1 正常肝干细胞的培养 将 WBF-344 细胞接种于含 10%胎牛血清的高糖培养基(包含 100×10^4 U/L 青霉素及 100 mg/L 链霉素)中,培养条件为 37 ℃、5% CO_2 专用细胞培养箱。每 2~3 d 进行 1 次传代,选取对数期的细胞进行后续实验。

1.2.2 稳定转染细胞株的构建 将 WBF-344 细胞以约 2.5×10^5 接种于 6 孔板中。实验分为 3 组:正常对照(normal)组、空载对照(vector)组和过表达(over expression-ATAD3A,OE-ATAD3A)组。待细胞生长至 6 孔板 70%~80%时,向培养基中加入浓度为 0、2、4、6、8、10 ng/mL 的嘌呤霉素,每隔 1 d 更换 1 次培养基,连续培养 2 周,最终确定嘌呤霉素的最低工作浓度为 1 ng/mL。参照说明书以最适滴度的含过表达 ATAD3A 基因的慢病毒转染入 WBF-344 细胞,即为过表达组;同时将不携带过表达 ATAD3A 基因的载体转入 WBF-344 细胞,即为空载对照组;正常对照组不做额外处理。在 vector 组和 OE-ATAD3A 组转染 48 h 后留

表 1 引物序列

基因	上游引物	下游引物
ATAD3A	5′-AGGAAGCGAGCAACTGAAAA-3′	5′-CAAAGCAGACCATCTCGTCA-3′
E-cadherin	5′-TTGAGAATGAGGTCGGTGCC-3′	5′-CAGAATGCCCTCGTTGGTCT-3′
N-cadherin	5′-GGGTCATCCCTCCGATCAAC-3′	5′-ATGAAGATGCCCGTTGGAGG-3′
ZEB1	5′-TGCCCAAACTGCAAGAAACG-3′	5′-GGACTGCCTGGTGATGTTGA-3′
ZEB2	5′-CTCGCAGCACATGAATCACAG-3′	5′-ATGCTCTGCAAGTAAGCCCG-3′
GAPDH	5′-AGTGCCAGCCTCGTCTCATA-3′	5′-GACTGTGCCGTTGAACTTGC-3′

取四分之一的细胞于原孔板中,其余细胞进行冻存。向细胞中加入终浓度为 1 ng/mL 的嘌呤霉素,连续筛选培养 3~4 周。在筛选出单克隆细胞后将细胞转接于 10 cm 直径的细胞培养皿中继续扩大培养,此后每次传代留取部分冻存,其余进行后续实验研究。

1.2.3 细胞形态观察 在获得稳定转染细胞后,以 0.25%的胰酶消化传代培养,当完全贴壁培养约 12 h 后应用倒置相差显微镜(日本尼康)观察细胞形态变化情况,观察倍数为 100 倍。

1.2.4 实时荧光定量 PCR 检测基因的表达 收集扩增后的细胞用 TRIzol 法提取 WBF-344 细胞的总 RNA 后,依据 TaKaRa 公司反转录试剂盒说明书步骤合成 cDNA,再按照 RT-qPCR 试剂盒说明书步骤进行 PCR 扩增。实验中所有引物由四川擎科生物公司合成。扩增条件为 95 ℃预变性 1 min,95 ℃变性 10 s,60 ℃退火 10 s,共计进行 40 个循环,此后 65~95 ℃进行溶解曲线检测引物特异性。采用 $2^{-\triangle\triangle Ct}$ 法计算 WBF-344 细胞中各个目标基因的表达水平。

1.2.5 Western blot 检测蛋白表达 每组收集 2 个 10 cm 直径培养皿的细胞后,参照凯基全蛋白提取试剂盒说明书的方法提取 WBF-344 细胞的总蛋白,之后参照索莱宝 BCA 蛋白定量检测试剂盒说明书对所提取的蛋白进行浓度测定。取定量合格总蛋白,加入上样缓冲液充分混匀后,在沸水中变性 15 min。取适量的样品进 SDS-PAGE 电泳分离,采用转膜仪将目标分子量的蛋白转至 PVDF 膜上,放入 5%的脱脂奶粉中封闭 1 h。之后加入目标抗体在 4 ℃环境过夜孵育,第 2 天拿出用 TBS 洗涤,添加对应二抗在室温孵育 1 h 后,再次洗涤干净,之后利用化学发光仪检测 ECL 显影。应用 Image Pro Plus 6.0 软件测定条带灰度值计算结果。

1.2.6 划痕实验检测细胞迁移能力 在 6 孔板中按每组 3 个孔各接种同等适宜数量的细胞,待细胞生长至 70%~80%后,在孔板底部用记号笔横向画 3 条横线,用 20 μL 的枪头沿直尺纵向在每个孔中划出同样宽度痕缝,用 PBS 清洗至无漂浮细胞后继续培养。拍照记录 0、24、48、72 h 细胞生长状态,每次拍照位点为记号笔横线和划痕交叉处横线上下各取一个视野的区域。

1.2.7 Transwell 实验检测细胞侵袭能力 将 3 组细胞常规消化后,添加无血清的 DMEM 培养基制备 1×10^6/mL 的细胞悬液。实验前以浓度为 1 g/L 的基质胶对 Transwell 小室上室聚碳酸酯微孔膜进行包被,于培养箱内聚合反应 30 min 后,向 24 孔板 Transwell 小室的上层小室中加入 200 μL 细胞悬液,下层小室中加入含 10%胎牛血清的 DMEM 高糖培养基,每组实验重复 3 次。在细胞培养箱中常规培养 48 h 后,取出小室用 10%中性甲醛固定。用棉签轻柔地将小室膜内侧黏附细胞搽除,之后用 0.1%结晶紫溶液对小室膜外侧染色 30 min,洗涤晾干后取下小室膜,利用载玻片封片以后在显微镜下观察、拍照。

1.2.8 裸鼠皮下成瘤检测恶性转化程度 取各组对数期细胞,胰蛋白酶消化以后用无血清培养基洗涤重悬,制备成单细胞悬液(5×10^7/mL)。取 5 周龄左右的 SPF 级裸鼠,分别于裸鼠左右两侧臀部皮下注射已制备好的细胞悬液 200 μL,每隔 1 d 观察记录有无瘤体形成。

1.3 统计学分析

采用 SPSS13.0 统计软件。数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,两组间比较采用独立样本 t 检验,多组间比较采用单因素方差分析。

2 结果

2.1 成功构建过表达 ATAD3A 细胞株

在转染病毒后,RT-qPCR 检测结果显示,与 normal 组和 vector 组比较,OE-ATAD3A 组 ATAD3A 基因表达明显升高($P<0.01$,图 1A);通过 Western blot 验证蛋白表达水平也明显升高(图 1B)。将细胞株进行爬片培养,并用 CD133 进行干性标记染色,结果 3 组并无明显差别(图 1C)。

2.2 过表达 ATAD3A 后细胞形态发生改变

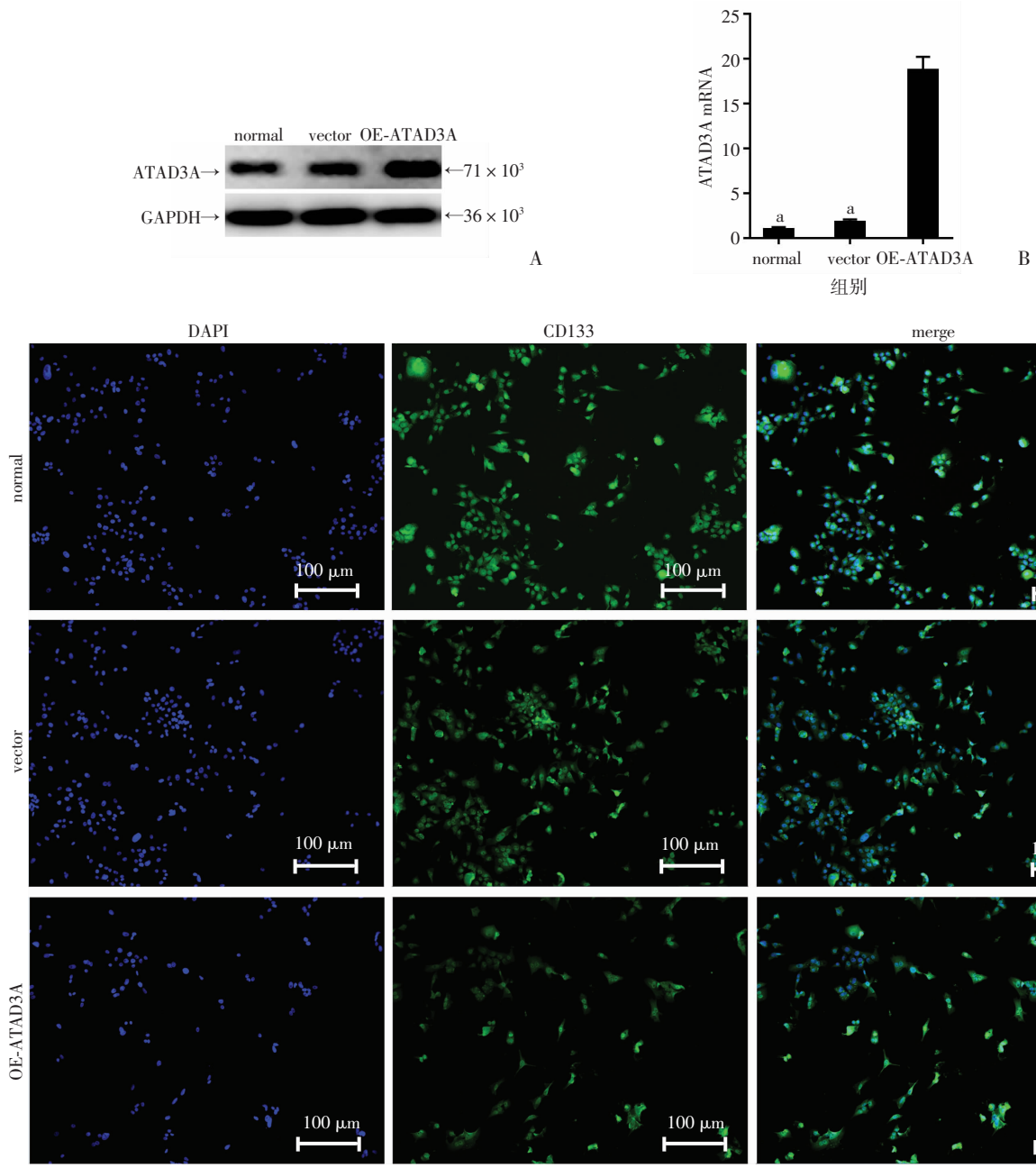
倒置相差显微镜观察结果发现,normal 组细胞呈卵圆状上皮样特点生长,vector 组形态与 normal 组相似,而 OE-ATAD3A 组细胞形态发生明显改变,表现为由卵圆形向长条形和梭形的间质细胞形态特征转变。提示过表达 ATAD3A 后可能促使 WBF-344 细胞发生 EMT 转变。

2.3 过表达 ATAD3A 后增强细胞迁移能力

细胞划痕实验显示,与 vector 组和 normal 组比较,OE-ATAD3A 组 WBF-344 细胞的迁移速度明显增加(图 3),差异有统计学意义($P<0.05$)。

2.4 过表达 ATAD3A 后增强细胞侵袭能力

Transwell 小室实验观察显示,OE-ATAD3A 组的细胞侵袭能力明显高于 vector 组和 normal 组(图 4),差异有统计学意义($P<0.01$,图 5)。



A：PCR 验证 mRNA 相对表达量；B：Western blot 验证蛋白水平的表达量($n=3$, $\bar{x}\pm s$)；a：$P<0.01$,与 OE-ATAD3A 组比较；C：CD133 标记染色结果

图 1　WBF-344 细胞稳定过表达 ATAD3A 基因的验证及干性鉴定

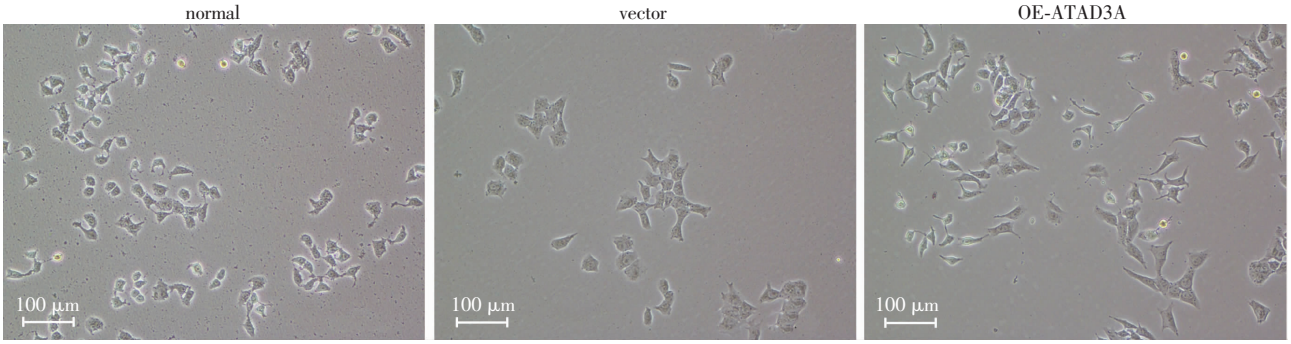


图 2　过表达 ATAD3A 后细胞形态学观察

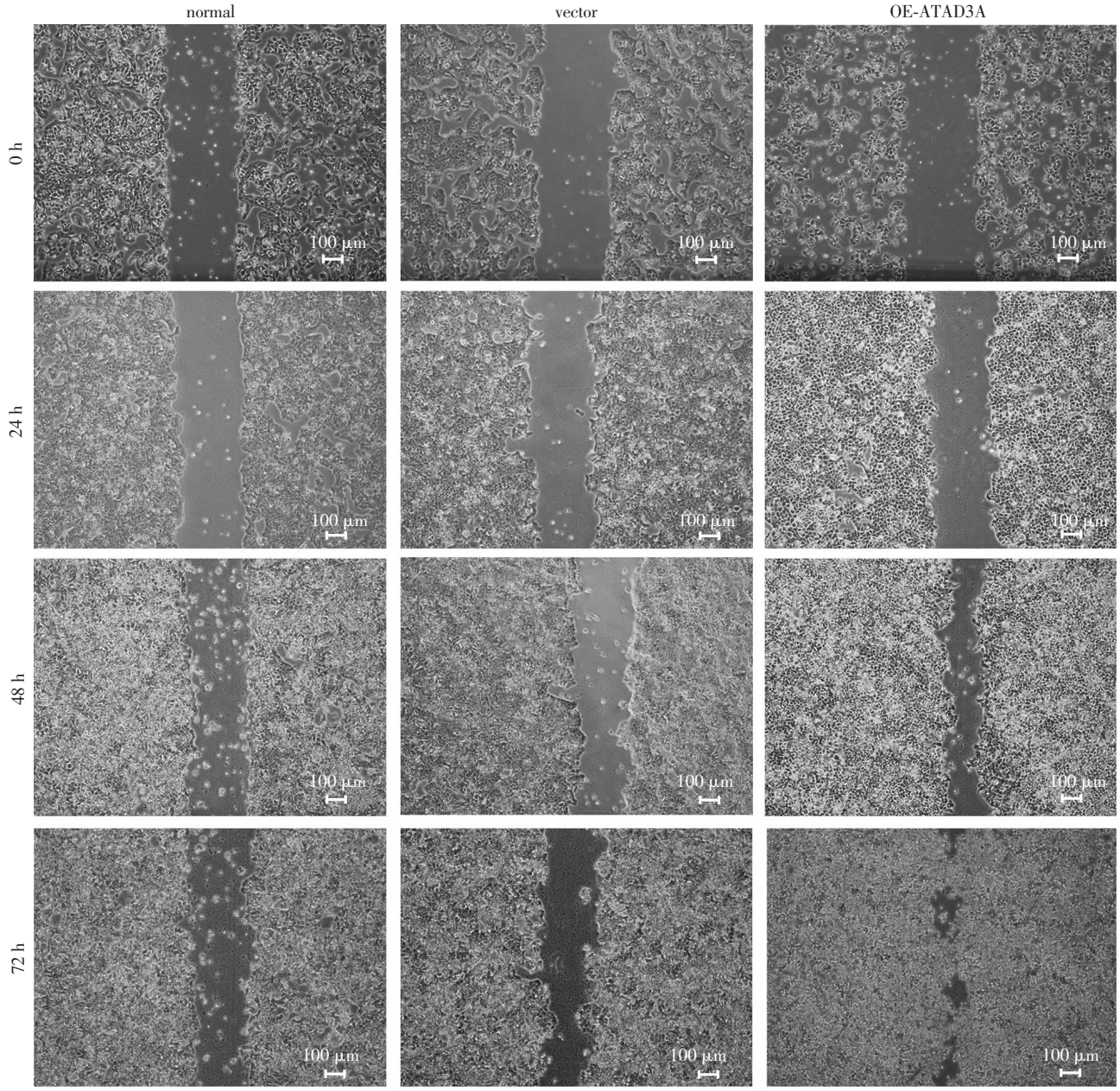


图 3　细胞划痕实验检测稳定过表达 ATAD3A 细胞的迁移能力

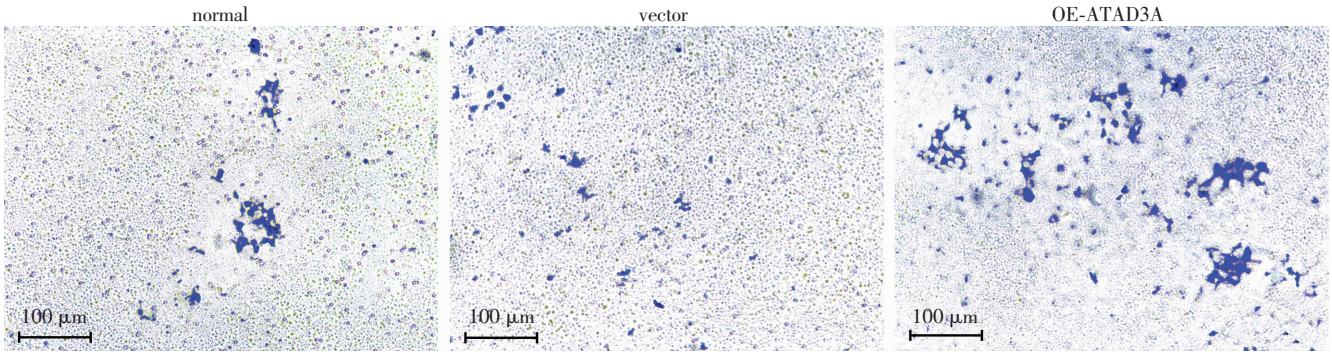
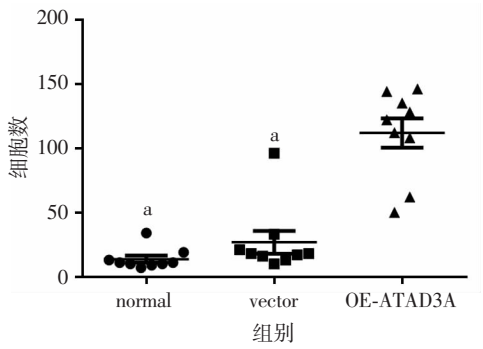


图 4　结晶紫染色观察过表达 ATAD3A 后对 WBF-344 细胞侵袭能力的影响



a:$P<0.01$,与 OE-ATAD3A 组比较

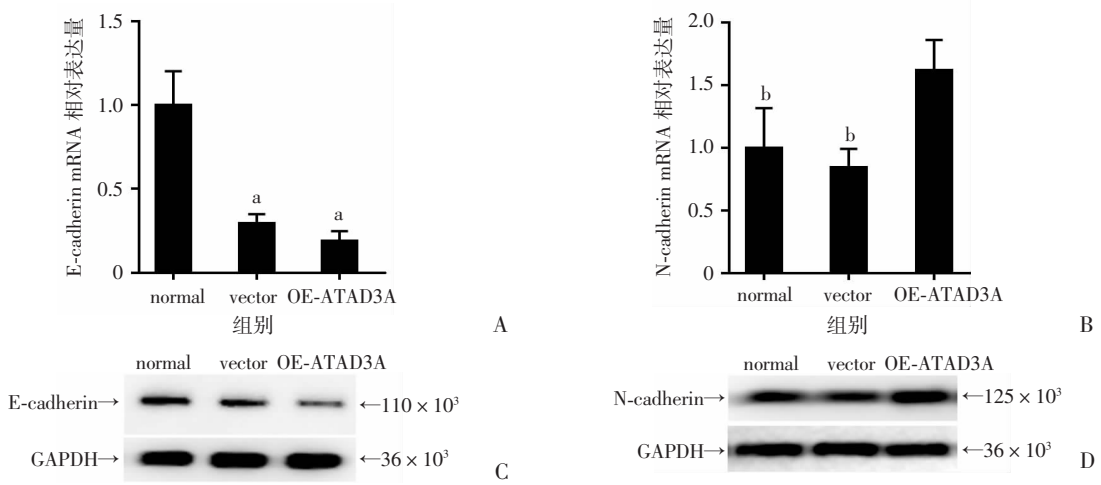
图 5 过表达 ATAD3A 后各组染色细胞数分析 ($n=9$, $\bar{x}\pm s$)

2.5 EMT 相关表面标志物表达发生改变

设计 EMT 相关细胞上皮标志物 E-cadherin 和间质标志物 N-cadherin 的引物,通过 PCR 的方法检测其基因表达情况。结果显示,与 vector 组和 normal 组比较,OE-ATAD3A 组上皮标志物 E-cadherin 表达量明显降低(图 6A),而间质标志物 N-cadherin 的表达量明显升高(图 6B);Western blot 检测其蛋白表达情况与基因表达一致(图 6C、D)。差异均有统计学意义($P<0.05$)。提示过表达 ATAD3A 可以促进 WBF-344 细胞发生 EMT 的特征转变。

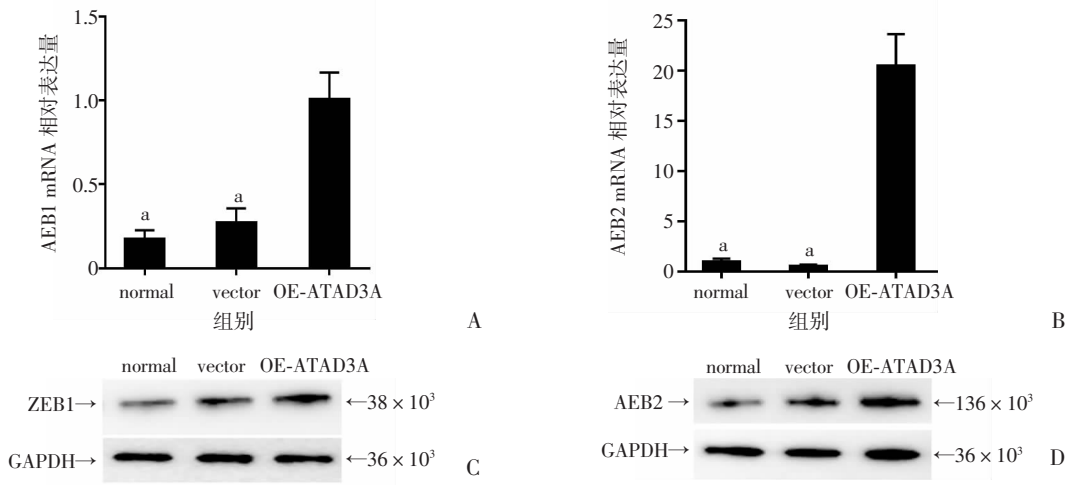
2.6 EMT 相关转录因子发生改变

设计与 EMT 标志物相关的转录因子 ZEB1 和 ZEB2 的引物,通过 PCR 检测其基因表达情况,Western blot 法检测其蛋白表达变化。结果显示与 vector 组和 normal 组比较,OE-ATAD3A 组上皮标志物 E-cadherin 和间质标志物 N-cadhein 转录相关 ZEB1/ZEB2 的基因表达明显升高($P<0.01$, 图 7A、B),其蛋白表达也呈现一致的变化趋势($P<0.01$, 图 7C、D)。



a:$P<0.01$,b:$P<0.05$,与 OE-ATAD3A 组比较; A:PCR 验证 E-cadherin 的 mRNA 相对表达量;B:PCR 验证 N-cadherin 的 mRNA 相对表达量;C:Western blot 检测 E-cadherin 蛋白的表达;D:Western blot 检测 N-cadherin 蛋白的表达

图 6 检测 EMT 相关表面标记的结果 ($n=6$, $\bar{x}\pm s$)



a:$P<0.01$,与 OE-ATAD3A 组比较; A: PCR 检测 ZEB1 的基因表达;B:PCR 检测 ZEB2 的基因表达;C:Western blot 检测 ZEB1 蛋白的表达;D:Western blot 检测 ZEB2 相关蛋白的表达

图 7 EMT 相关转录因子的检测结果 ($n=6$, $\bar{x}\pm s$)

2.7 裸鼠皮下成瘤实验结果

将各组细胞接种裸鼠皮下以后,观察3周,未能观察到肿瘤块的形成。提示过表达ATAD3A后能促使WBF-344细胞发生EMT,促进侵袭和迁移能力增强,但是其诱导的恶性程度还不足以使细胞发展成为恶性肿瘤。

3 讨论

原发性HCC是我国常见的恶性肿瘤之一,其发现晚,治疗效果差,患者的平均5年生存率不足15%[1],寻找有效的早期诊断标志,早期治疗是目前公认的能有效提高患者生存时间的方法。甲胎蛋白虽然是目前临床运用最多,特异性较高的预测标志[18],新近的研究也发现一些其他分子,如miRNA-7也能有效预测HCC患者的发生和预后[19]。因此,筛选更有效的分子标记对早期发现HCC以及对患者的治疗十分重要。

近年来发现ATAD3A是功能多样的干细胞线粒体膜蛋白超家族中的一员,以保守的AAA^+模块序列为特征[20-21],对几种有机体的发育至关重要,包括秀丽隐杆线虫、黑腹果蝇和小家鼠等[15-17]。ATAD3A又作为脂质和脂肪酸代谢的关键调节器,参与代谢性疾病[22-23]。已有研究报道,在胶质瘤、肺腺癌、子宫颈癌和头颈部肿瘤中ATAD3A呈现异常表达,尤其是在某些特定情况下,与早癌的发生和癌症复发后总生存率有关[10-14]。尽管其在发育和部分肿瘤中的作用已经得到证实,但是ATAD3A在肝癌发生、发展中的机制,尤其是对肝干细胞的影响仍然不清楚。因此,本研究旨在探讨过表达ATAD3A基因对大鼠LNSCs系(WBF-344)发生EMT过程的调控作用,进一步分析过表达ATAD3A基因对WBF-344细胞恶性转化的影响。结果显示ATAD3A的过表达与大鼠肝干细胞的侵袭和转移有密切的关系,与对照组比较,过表达ATAD3A后WBF-344细胞形态发生明显改变,表现为由卵圆形向长条形和梭形的间质细胞形态特征转变,WBF-344细胞的侵袭和迁移能力得到明显的增强,提示可能发生EMT转变。进一步研究显示,过表达ATAD3A后,与EMT相关的上皮标志物E-cadherin表达量明显降低,而间质标志物N-cadherin表达量则明显升高,证实了我们起初的猜想。再次验证与E-cadherin和N-cadherin转录相关的上游转录因子ZEB1和ZEB2的表达,也得到了相同的表达趋势的结果。提示过表达ATAD3A能诱导WBF-344细胞的EMT发生、发展,其可能与E-cadherin和N-cadherin的上游转录因子相关。

在癌细胞中ATAD3A的过表达与肿瘤生长和转移密切相关,而ATAD3A的突变和缺失与发育和神经障碍有关[23-24]。结合本研究和前期文献基础,证实在LNSCs中过表达ATAD3A能诱导EMT的发生,并促进LNSCs的侵袭和转移。ATAD3A的过表达能增加癌细胞合成代谢,特别是对于类固醇合成和对化学疗法和放射疗法的抗性,部分通过抑制自噬和线粒体自噬来实现[25]。最近已经证明几种调节ATAD3A在控制线粒体功能中的分子机制,包括mTOR-ATAD3A功能轴和ATAD3A-FAT1相互作用[26]。这些发现支持ATAD3A在肿瘤发生和发展中的关键作用。作为潜在的致癌基因,ATAD3A代表了开发抗癌新疗法的良好候选者。本研究表明,过表达ATAD3A后能诱导大鼠LNSCs发生EMT,并增强细胞的侵袭和迁移能力。但其具体的分子机制,还需进一步的研究分析。总之,ATAD3A可能是一种新的人类癌症治疗靶点。

参考文献:

[1] WU J, YANG S G, XU K J, *et al*. Patterns and trends of liver cancer incidence rates in Eastern and Southeastern Asian countries (1983-2007) and predictions to 2030[J]. Gastroenterology, 2018, 154(6): 1719-1728.e5. DOI: 10.1053/j.gastro.2018.01.033.

[2] LI W, LI Q, JING L, *et al*. P57-mediated autophagy promotes the efficacy of EGFR inhibitors in hepatocellularcarcinoma[J]. Liver Int, 2019, 39(1): 147-157. DOI: 10.1111/liv.13957.

[3] ARVIO M, MONONEN I. Aspartylglycosaminuria: a review[J]. Orphanet J Rare Dis, 2016, 11: 162. DOI: 10.1186/s13023-016-0544-6.

[4] LIU W H, WANG X, YOU N, *et al*. Efficient enrichment of hepatic cancer stem-like cells from a primary rat HCC model via a density gradient centrifugation-centeredmethod[J]. PLoS ONE, 2012, 7(4): e35720. DOI: 10.1371/journal.pone.0035720.

[5] LUO H, LIU W H, LIANG H Y, *et al*. Differentiation-inducing therapeutic effect of Notch inhibition in reversing malignant transformation of liver normal stem cells via MET[J]. Oncotarget, 2018, 9(27): 18885-18895. DOI: 10.18632/oncotarget.24421.

[6] SUZUKI A, SEKIYA S, ONISHI M, *et al*. Flowcytometric isolation and clonal identification of self-renewing bipotent hepatic progenitor cells in adult mouse liver[J]. Hepatology, 2008, 48(6): 1964-1978. DOI: 10.1002/hep.22558.

[7] XIE H, LIAO N, LAN F, *et al*. 3D-cultured adipose tissue-derived stem cells inhibit liver cancer cell migration and invasion through suppressing epithelial-mesenchymal transition[J]. Int J Mol Med, 2018, 41(3): 1385-1396. DOI: 10.3892/ijmm.2017.3336.

[8] GILQUIN B, TAILLEBOURG E, CHERRADI N, *et al*. The AAA+ ATPase ATAD3A controls mitochondrial dynamics at the interface of the inner and outermembranes[J]. Mol Cell Biol, 2010, 30(8): 1984-1996. DOI: 10.1128/MCB.00007-10.

[9] JIN G, XU C, ZHANG X, *et al*. Atad3a suppresses Pink1-dependent mitophagy to maintain homeostasis of hematopoietic progenitor cells[J]. Nat Immunol, 2018. 19(1): 29-40. DOI: 10.1038/s41590-017-0002-1.

[10] HUBSTENBERGER A, LABOURDETTE G, BAUDIER J, *et al*. ATAD 3A and ATAD 3B are distal 1p-located genes differentially expressed in humanglioma cell lines and present *in vitro* anti-oncogenic and chemoresistant properties [J]. Exp Cell Res, 2008, 314(15): 2870-2883. DOI: 10.1016/j.yexcr.2008.06.017.

[11] YOU W C, CHIOU S H, HUANG C Y, *et al*. Mitochondrial protein ATPase family, AAA domain containing 3A correlates withradioresistance in glioblastoma[J]. Neuro-oncology, 2013, 15(10): 1342-1352. DOI: 10.1093/neuonc/not077.

[12] CHIANG S F, HUANG C Y, LIN T Y, *et al*. An alternative import pathway of AIF to the mitochondria[J]. Int J Mol Med, 2012. 29(3): 365-372. DOI: 10.3892/ijmm.2011.849.

[13] CHEN T C, HUNG Y C, LIN T Y, *et al*. Human papillomavirus infection and expression of ATPase family AAA domain containing 3A, a novel anti-autophagy factor, in uterine cervical cancer[J]. Int J Mol Med, 2011, 28(5): 689-696. DOI: 10.3892/ijmm.2011.743.

[14] FANG H Y, CHANG C L, HSU S H, *et al*. ATPase family AAA domain-containing 3A is a novel anti-apoptotic factor in lung adenocarcinoma cells[J]. J Cell Sci, 2010, 123(Pt 7): 1171-1180. DOI: 10.1242/jcs.062034.

[15] HOFFMANN M, BELLANCE N, ROSSIGNOL R, *et al*. C. elegans ATAD-3 is essential for mitochondrial activity and development[J]. PLoS ONE, 2009, 4(10): e7644. DOI: 10.1371/journal.pone.0007644.

[16] KAMATH R S, FRASER A G, DONG Y, *et al*. Systematic functional analysis of theCaenorhabditis elegans genome using RNAi[J]. Nature, 2003, 421(6920): 231-237. DOI: 10.1038/nature01278.

[17] GOLLER T, SEIBOLD U K, KREMMER E, *et al*. Atad3 function is essential for early post-implantation development in the mouse[J]. PLoS ONE, 2013, 8(1): e54799. DOI: 10.1371/journal.pone.0054799.

[18] BAI D S, ZHANG C, CHEN P, *et al*. The prognostic correlation of AFP level at diagnosis with pathological grade, progression, and survival of patients with hepatocellularcarcinoma[J]. Sci Rep, 2017, 7(1): 12870. DOI: 10.1038/s41598-017-12834-1.

[19] KABIR T D, GANDA C, BROWN R M, *et al*. A micro RNA-7/growth arrest specific 6/TYRO3 axis regulates the growth and invasiveness ofsorafenib-resistant cells in human hepatocellular carcinoma[J]. Hepatology, 2018, 67(1): 216-231. DOI: 10.1002/hep.29478.

[20] IYER L M, LEIPE D D, KOONIN E V, *et al*. Evolutionary history and higher order classification of AAA+ ATPases [J]. J Struct Biol, 2004, 146(1/2): 11-31. DOI: 10.1016/j.jsb.2003.10.010.

[21] SNIDER J, THIBAULT G, HOURY W A. The AAA+ superfamily of functionally diverseproteins [J]. Genome Biol, 2008, 9(4): 216. DOI: 10.1186/gb-2008-9-4-216.

[22] DIENSTMANN R, RODON J, PRAT A, *et al*. Genomic aberrations in the FGFR pathway: opportunities for targeted therapies in solidtumors[J]. Ann Oncol, 2014, 25(3): 552-563. DOI: 10.1093/annonc/mdt419.

[23] DESAI R, FRAZIER A E, DURIGON R, *et al*. ATAD3 gene cluster deletions cause cerebellar dysfunction associated with altered mitochondrial DNA and cholesterol metabolism [J]. Brain, 2017, 140(6): 1595-1610. DOI: 10.1093/brain/awx094.

[24] COOPER H M, YANG Y, YLIKALLIO E, *et al*. ATPase-deficient mitochondrial inner membrane protein ATAD3A disturbs mitochondrial dynamics in dominant hereditary spastic paraplegia[J]. Hum Mol Genet, 2017, 26(8): 1432-1443. DOI: 10.1093/hmg/ddx042.

[25] TENG Y, LANG L W, SHAY C. ATAD3A on the path tocancer[J]. Adv Exp Med Biol, 2019, 1134: 259-269. DOI: 10.1007/978-3-030-12668-1_14.

[26] CHEN D Y, YUAN X H, LIU L J, *et al*. Mitochondrial ATAD3A regulates milk biosynthesis and proliferation of mammary epithelial cells from dairy cow via themTOR pathway[J]. Cell Biol Int, 2018, 42(5): 533-542. DOI: 10.1002/cbin.10929.

(**收稿**:2019-07-15;**修回**:2019-09-19)

(编辑 汪勤俭)