

TfR-Ubi 融合蛋白稳定表达株的构建及功能初测

沈婷婷, 刘宁生*

南京医科大学病理学系, 江苏 南京 211166

[摘要] 目的:通过构建转铁蛋白受体-泛素(transferrin receptor-ubiquitin, TfR-Ubi)融合蛋白,研究胞内体蛋白分选机制。方法:首先扩增小鼠泛素和人源转铁蛋白受体基因,构建HA-TfR-Ubi表达质粒,转染A431细胞后,采用Western blot验证融合蛋白的表达。在稳定表达TfR-Ubi的A431和Hrs-KO MEF细胞株中,转铁蛋白刺激,免疫荧光法观察TfR-Ubi融合蛋白在细胞内的位置。结果:成功构建HA-TfR-Ubi表达质粒,免疫荧光结果提示TfR-Ubi融合蛋白被分选到晚期内体(late endosome)/溶酶体,Hrs-KO MEF细胞中TfR-Ubi融合蛋白分选受到影响。结论:TfR-Ubi融合蛋白在胞内体被分选,证明了泛素修饰改变了转铁蛋白受体的降解方式,为胞内体分选转运装置(endosomal sorting complex required for transport, ESCRT)分选机制研究提供了实验工具。**[关键词]** 胞内体分选;泛素;转铁蛋白受体;降解
[中图分类号] Q784 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1007-4368(2018)07-909-06
doi:10.7655/NYDXBNS20180708

Construction and functional analysis of TfR-Ubi fusion protein

Shen Tingting, Liu Ningsheng*

Department of Pathology, NMU, Nanjing 211166, China

[Abstract] **Objective:** To investigate the mechanism of endosomal sorting by constructing the transferrin receptor-ubiquitin (TfR-Ubi) protein. **Methods:** Mouse ubiquitin and human transferrin receptor genes were amplified to construct HA-TfR-Ubi plasmid. Then the expression of HA-TfR-Ubi protein was confirmed by Western blot following by transfected into A431 cells. The A431 and Hrs-KO MEF cells stably expressing HA-TfR-Ubi were treated with transferrin, and the location of HA-TfR-Ubi fusion protein was observed in the cells by immunofluorescence. **Results:** pHA-TfR-Ubi was successfully constructed. Immunofluorescence results showed that HA-TfR-Ubi fusion protein was sorted into late endosome/lysosomal, and its endosomal sorting was affected in Hrs-KO MEF cells. **Conclusion:** The endosomal sorting of TfR-Ubi fusion protein demonstrated that the ubiquitin label changed the transferrin receptor degradative pathway. TfR-Ubi plasmid provided a useful experimental tool for the study of ESCRT sorting mechanism.
[Key words] endosome sorting; ubiquitin; transferrin receptor; degradation

[Acta Univ Med Nanjing, 2018, 38(07):909-914]

内吞是胞外大分子与质膜上受体结合,质膜凹陷成有被小窝并从膜上脱离形成小泡,小泡与早期内体结合形成胞内体并被分选,然后进入不同的循环或降解途径,从而维持细胞的正常代谢和信号转导功能^[1]。有一些膜蛋白如表皮生长因子受体(epithelial growth factor receptor, EGFR)内吞后在早期胞内体中被分选入多泡体/溶酶体降解,维持EGFR信

号通路的正常作用,保持生物体的正常功能^[2]。还有些膜蛋白如转铁蛋白受体,在早期内体(early endosome)中释放铁,空载的转铁蛋白受体循环回到细胞膜上,转铁蛋白受体的重复利用可以维持铁离子内稳态平衡^[3-5]。

泛素(ubiquitin, Ubi)是含有76个氨基酸序列的高度保守的多肽^[6],研究表明泛素在受体的分选过程中发挥巨大的作用。泛素与受体蛋白共价结合依赖泛素酶相互协作,泛素化修饰可以分为单泛素化、单个泛素多位点结合和多聚泛素链^[7]。不同的

[基金项目] 国家自然科学基金(31171289)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: liuns@hotmail.com

泛素结合方式可以对受体产生不同作用,单泛素修饰在胞内分选中起到信号肽的作用^[8],使受体被分选到溶酶体降解^[9],而多聚泛素化受体进入蛋白酶体降解途径。泛素结合受体运输途径是由胞内体分选转运装置(endosomal sorting complex required for transport, ESCRT)介导分选的^[10],ESCRT由4个复合物和其他一些辅助组分构成^[11]。这4个复合物分别是ESCRT-0、ESCRT-I、ESCRT-II和ESCRT-III,其中ESCRT-0由Hrs(hepatocyte growth factor-regulated tyrosine kinase substrate)亚基和STAM(signal transduction adaptor molecule)亚基组成^[12],Hrs-STAM复合物在分选过程中发挥至关重要的作用。Hrs的FYVE锌指结构能与胞内体脂质磷脂酰肌醇-3磷酸盐(PI3P)结合而被富集到早期内体膜上^[13],Hrs和STAM都含有泛素结合基序(ubiquitin interacting motif, UIM),识别内吞的泛素化蛋白促进多泡体(MVB)形成发挥胞内分选作用^[14]。ESCRT-I从结构上看含有1个“帽子”结构、1个刚性茎结构以及末端结构。其“帽子”结构能够与ESCRT-II结合,末端结构含有泛素蛋白结合结构域和泛素结合酶E2(ubiquitin conjugating enzyme E2 variant, UEV)结构域,UEV结构域能与ESCRT-0结合。ESCRT-II含有GRAM样泛素蛋白结合结构域(GLUE),能与泛素蛋白和ESCRT-I结合,帮助ESCRT-II富集到内体膜上。ESCRT-III是由小分子亚基以高度有序的方式组装而成的,特定亚基能与ESCRT-II结合,可以被富集到内体膜上^[15-16]。泛素化蛋白依次与ESCRT复合物结合,最终与ESCRT-III结合,并且ESCRT-III富集去泛素化酶(deubiquitylating enzymes, DUB)到胞内体使泛素化蛋白脱泛素,随后转运到MVB,再到晚期内体(late endosome)/溶酶体降解^[16-18]。

Tom1L1是Tom1家族蛋白的成员,存在于胞质中,含有VHS(Vps、Hrs和STAM)结构域和GAT结构域,其VHS结构域能与Hrs结合而被富集到胞内体膜上,GAT结构域与泛素化蛋白结合将泛素化蛋白富集到内体膜上,随后进入溶酶体降解途径。Tom1L1能一直与内吞的受体共定位于内吞小泡和胞内体^[19-20]。

本研究利用泛素和转铁蛋白受体(transferrin receptor, TfR)来构建转铁蛋白受体-泛素(transferrin receptor-ubiquitin, TfR-Ubi)融合蛋白,TfR-Ubi在胞内体中被ESCRT识别,并分选进入晚期内体/溶酶体。已有研究表明在Hrs-KO MEF细胞中,泛素化蛋白不能定位到胞内体,Hrs对泛素化蛋白定位到

胞内体及胞内聚集是必不可少的^[21]。因此在本实验中使用Hrs-KO MEF细胞,观察TfR-Ubi融合蛋白在细胞内定位和聚集情况,为进一步研究ESCRT胞内体分选过程及为接下来机制研究提供实验工具。

1 材料和方法

1.1 材料

A431细胞和大肠杆菌DH5- α 由本实验室保存,Hrs-KO MEF细胞由日本Kazuo Sugamura博士馈赠。小鼠cDNA(Clontech公司,美国),pDHA-neo质粒及pTom1L1质粒来自新加坡Hong Wanjin博士实验室。RNA提取试剂盒(QIAGEN公司,美国);LA Taq、DNA marker、内切酶EcoR I、Sal I、Not I(TaKaRa公司,日本);T4连接酶(Promega公司,美国);转铁蛋白(Sigma公司,美国);鼠抗HA抗体、鼠抗Tom1L1抗体、鼠抗溶酶体相关膜蛋白(lysosomal-associated membrane protein 1, LAMP1)抗体、鼠抗 β -Tubulin抗体(Affinity公司,美国);HRP-兔抗鼠IgG抗体(Santa Cruz公司,美国);过氧化物酶底物显示液(Pierce公司,美国);FITC标记兔抗鼠IgG抗体(Sigma公司,美国)。

1.2 方法

1.2.1 TfR-Ubi融合蛋白表达载体的构建

以人胎脑cDNA文库为模板进行PCR扩增转铁蛋白受体基因。引物序列由南京金斯瑞生物科技有限公司合成:上游引物:5'-ACGCGTCGACCATGATG-GATCAAGCTAGATCAGCA-3',下游引物:5'-AAA-AGGAAAACGCCGCGGAACTCATTGTCAATGTCC-CAAAC-3',在转铁蛋白受体两端分别加入Sal I和Not I酶切位点。以鼠cDNA为模板进行PCR扩增泛素基因。引物序列为:上游引物:5'-GATCCCCG-AATTCATGCGAGATCTTCGTGAAGACC-3',下游引物:5'-GCGCCGTCGCGGGTCGACTCTCGTGATTGT-TGGATCTGCATGCCACCTCTCAGGCG-3',在泛素两端分别加入EcoR I和Sal I酶切位点。

将转铁蛋白和泛素基因的PCR产物进行凝胶电泳,回收目的条带。同时对泛素基因和pDHA-neo进行双酶切消化,用T4连接酶连接后转化感受态DH5- α ,挑取单克隆摇菌。进行菌液PCR检测,对阳性者提质粒并测序验证,命名为HA-Ubi质粒。对转铁蛋白受体和HA-Ubi质粒进行双酶切和连接,步骤同上,命名为HA-TfR-Ubi质粒。

1.2.2 HA-TfR-Ubi质粒转染A431细胞和蛋白提取 测定A431细胞密度,按 1×10^6 个/孔密度铺6孔

板,首先用pEGFP-C1对细胞进行转染条件优化,将2 μ g pEGFP-C1质粒混入终体积为50 μ L的Opti-MEM培养基中,将Lipofectamine™转染试剂5、6、7、8、9、10 μ L分别混入终体积为50 μ L的Opti-MEM培养基中,混匀,于室温下静置10 min。将两者混匀,室温下放置30 min, PBS洗涤,加入100 μ L Opti-MEM培养基,把质粒-转染试剂复合物加入细胞中,3 h后去培养基, PBS洗涤,加入新培养基(含血清),过夜。在显微镜下观察荧光强度,确定转染最佳剂量。按此比例转染HA-TfR-Ubi质粒,5 h后去除DNA转染复合物,加培养基继续培养,过夜,去培养基, PBS洗涤,加细胞裂解液,将细胞刮下,1 mL注射器反复吹打,使细胞充分裂解。离心,回收上清,去沉淀,加入5 \times 上样缓冲液20 μ L,混匀,沸水浴5 min变性,进行Western blot分析。

1.2.3 Western blot 检验

配制适当比例的SDS-PAGE凝胶,取上一步获得的样品20 μ L上样,100 V,2 h。完毕,转膜,100 V,1 h。用TBST溶解的脱脂奶粉封闭2 h,按1:500的浓度孵育HA抗体,4 $^{\circ}$ C过夜。次日,TBST洗涤,然后按1:1 000浓度孵育HRP标记的羊抗鼠IgG抗体,室温1 h。TBST洗涤,取出膜,吸干水分,加显色液,于成像系统进行曝光。

1.2.4 稳定表达TfR-Ubi的A431细胞株的筛选

在A431细胞中转染HA-TfR-Ubi质粒,传代至24孔板,培养6 h后换细胞液,12 h后加入G418进行筛选。在显微镜下观察细胞生长状态,于最佳状态挑取单克隆,继续培养。当细胞克隆覆盖率达15%左右时,消化细胞。重复上述步骤3次,确保获得表达TfR-Ubi的A431稳定表达株。

1.2.5 A431细胞免疫荧光检验

培养稳定表达TfR-Ubi的A431细胞株,第2天细胞饥饿处理,第3天在培养基中加入转铁蛋白,分别进行时间梯度处理0、3、5、10、30 min。去培养基, PBS洗涤;4%多聚甲醛固定20 min, PBS洗涤;加氯化铵,室温封闭2次各5 min, PBS洗涤;加2 mL 0.1% Triton X-100室温5 min打孔, PBS清洗5次洗涤,拍干。按1:50比例孵育鼠抗HA及鼠抗LAMP1抗体,室温2 h, PBS清洗10次洗涤,拍干。按1:50比例孵育FITC标记兔抗鼠IgG抗体,室温1 h, PBS洗涤,拍干水分。封片,晾干,于显微镜下观察荧光强度。

在A431的稳定表达株中转染pTom1L1,免疫荧光检测步骤同上(一抗:鼠抗HA及鼠抗Tom1L1抗体,1:100)。

1.2.6 稳定表达TfR-Ubi的Hrs-KO MEF细胞株的筛选

在Hrs-KO MEF细胞中转染HA-TfR-Ubi质粒,经过传代培养后加入到24孔板,培养6 h后换细胞液,12 h后加入G418进行筛选。在显微镜下观察细胞生长状态,于最佳状态,挑取单克隆,继续培养。当细胞克隆覆盖率达15%左右时,消化细胞。重复上述步骤3次,确保获得表达TfR-Ubi的Hrs-KO MEF细胞的稳定表达株。

1.2.7 Hrs-KO MEF细胞免疫荧光检验

在TfR-Ubi稳定表达株转染pTom1L1,5 h后去转染复合物,继续培养;第2天细胞饥饿处理,第3天在培养基中加入转铁蛋白,30 min后,去培养基, PBS洗涤;4%多聚甲醛固定20 min, PBS洗涤;加氯化铵,室温封闭2次各5 min, PBS洗涤;加2 mL 0.1% Triton X-100室温打孔5 min, PBS清洗5次洗涤,拍干。按1:100比例孵育鼠抗HA及鼠抗Tom1L1抗体,室温2 h, PBS清洗10次洗涤,拍干。按1:50比例孵育FITC标记兔抗鼠IgG抗体,室温1 h, PBS洗涤,拍干水分。封片,晾干,于显微镜下观察荧光强度。

2 结 果

2.1 泛素、TfR和TfR-Ubi基因扩增

人转铁蛋白受体基因、小鼠泛素基因片段和TfR-Ubi基因经PCR扩增,用1%凝胶电泳验证,可以看到泛素基因的相对分子量为200~300 bp(图1A),转铁蛋白受体基因片段的相对分子量为2 000~3 000 bp(图1B),TfR-Ubi基因片段大小在3 000 bp左右(图1C),与已知片段大小一致。

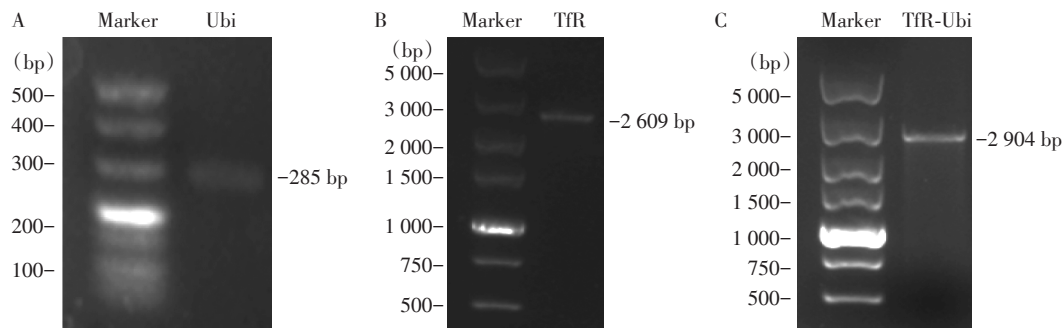
2.2 HA-TfR-Ubi质粒转染和表达

首先进行转染试剂用量优化,分别取5、6、7、8、9、10 μ L转染试剂转染pEGFP-C1进入细胞,24 h后观察荧光效果。结果显示以9 μ L转染试剂转染后,细胞荧光强度最强,据此后续实验所用转染剂量为9 μ L。

Western blot结果显示,HA-TfR-Ubi质粒转染细胞提取的上清于100 kDa大小处出现条带,与目的条带大小相符,未转染细胞提取的上清未出现条带。证明TfR-Ubi蛋白成功表达(图2)。

2.3 TfR-Ubi的内吞

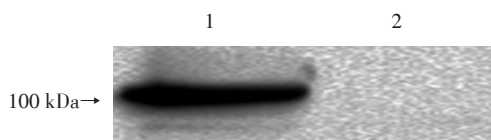
在表达TfR-Ubi的A431细胞稳定表达株中,由转铁蛋白处理细胞后,在0、3、5、10、30 min观察。免疫荧光结果显示,随着时间的延长,TfR-Ubi融合蛋白由膜结构逐渐变为小体结构(图3)。



A: 泛素基因 PCR 结果; B: 转铁蛋白受体基因 PCR 结果; C: TfR-Ubi PCR 结果。

图1 基因PCR扩增产物

Figure 1 The PCR results of the genes



1: 转染 HA-TfR-Ubi 质粒的 A431 细胞上清; 2: 未转染质粒的 A431 细胞上清。

图2 Western blot检测 HA-TfR-Ubi 蛋白表达

Figure 2 The expression of HA-TfR-Ubi detected by Western blot

2.4 TfR-Ubi 和 Tom1L1 在细胞内的定位

转铁蛋白刺激 A431 细胞 30 min, 免疫荧光显示 TfR-Ubi 融合蛋白和 LAMP1 能够共定位于晚期胞内体/溶酶体(图4A)。在过表达 Tom1L1 的 A431 细胞株中, 转铁蛋白刺激细胞 30 min, 结果显示 Tom1L1 也可以和 TfR-Ubi 共定位于晚期内体/溶酶体(图4B)。

2.5 Hrs 敲除对 TfR-Ubi 分选的影响

在 Hrs 敲除的 MEF 细胞中, 转铁蛋白刺激细胞

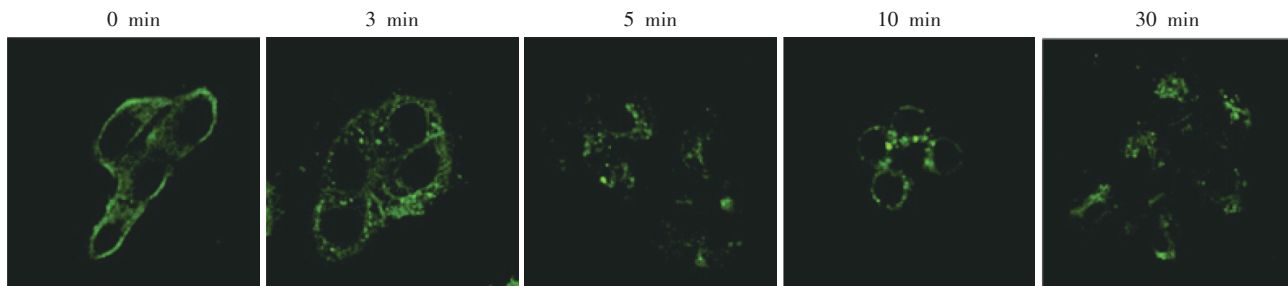


图3 TfR-Ubi 的结构演变($\times 1\,000$)

Figure 3 The structural evolution of TfR-Ubi($\times 1\,000$)

30 min, 免疫荧光结果显示 TfR-Ubi 所定位的胞内体数量变少, 体积变大, 且 Tom1L1 不再被吸引到胞内体上。

3 讨论

真核细胞是由多种细胞器组成的复杂系统, 各种物质胞内运输及代谢是多种细胞器协调作用的结果。膜受体通过其结构与配体发生结合, 在网格蛋白(clathrin)的协同作用下, 完成细胞外物质的摄取和信号转导^[22-23]。一部分泛素化受体-配体复合物在胞内体被 ESCRT 识别, 分选进入多泡体管腔内小泡, 随后通过 MVB 转运到晚期内体/溶酶体进行降解。泛素作为一种重要的细胞调节物质, 蛋白酶降解是泛素最为经典的功能, 此外, 近年来对泛素

的非蛋白降解作用的研究也取得了很大进展, 主要是单泛素化修饰受体在内体中被分选到不同路径, 影响受体命运以及信号转导强度和持续时间^[24]。

本研究构建了 TfR-Ubi 融合蛋白稳定表达株, 核酸电泳 TfR-Ubi 片段在 3 000 bp 左右, 结合 Western blot 结果显示 TfR-Ubi 融合蛋白的大小为 100 kDa, 表明载体成功构建。未经修饰的转铁蛋白受体在胞内完成铁释放后循环回膜表面, 免疫荧光结果显示 TfR-Ubi 融合蛋白内吞进入胞内小体, 并且我们将观察时间延长至 30 min, TfR-Ubi 依旧定位于细胞内, 表明泛素融合改变了转铁蛋白受体循环回细胞膜表面的经典通路; 免疫荧光结果显示在 30 min 时, TfR-Ubi 融合蛋白能与 LAMP1 和 Tom1L1 共定位于晚期内体/溶酶体中, 而 LAMP1 是晚期内体/溶酶体

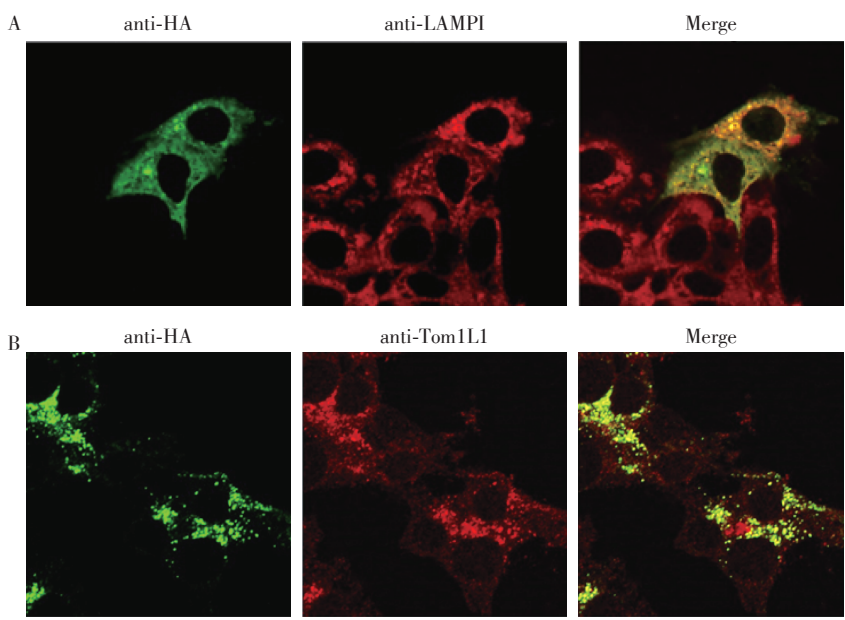


图4 TfR-Ubi和Tom1L1在细胞内的定位(×1 000)
Figure 4 The location of TfR-Ubi and Tom1L1 in the cells(×1 000)

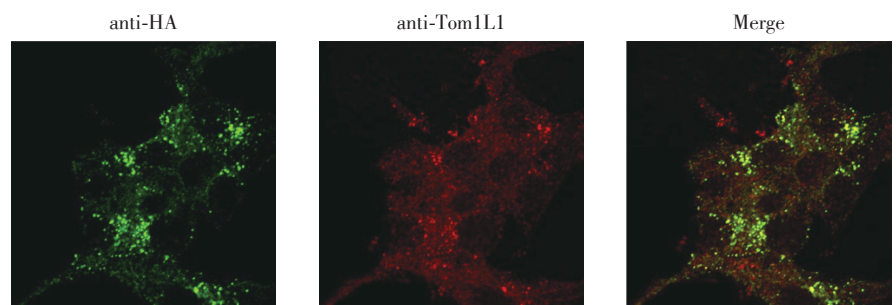


图5 免疫荧光检测Hrs敲除细胞Tom1L1和TfR-Ubi表达情况(×1 000)
Figure 5 Hrs-KO cells were analyzed by immunofluorescence microscopy to detect Tom1L1 and TfR-Ubi(×1 000)

的标记物, Tom1L1被富集到内体膜上, 与ESCRT复合物结合发挥胞内体分选作用, 表明TfR-Ubi在胞内被ESCRT转运装置分选到晚期内体/溶酶体。Hrs是ESCRT-0复合物上的亚基, 在胞内体中与泛素化受体结合并富集Tom1L1到内体膜上, 发挥胞内分选作用^[25-26]。在Hrs-KO细胞中Tom1L1不再被吸引到胞内体上, 表明ESCRT复合体分选机制受到干扰。而TfR-Ubi定位的胞内体数量变少, 体积变大, 这表明Hrs同时影响TfR-Ubi的胞内体分选, 证明TfR-Ubi可以作为研究ESCRT分选的标记物。

因此, 本研究构建的TfR-Ubi融合蛋白为深入研究Ubi/ESCRT分选机制提供了一个重要工具, 在接下来的工作中我们将利用TfR-Ubi融合蛋白进一步探究细胞内吞、分选和信号转导的机制。

[参考文献]

[1] Lu R, Drubin DG, Sun Y. Clathrin-mediated endocytosis

in budding yeast at a glance [J]. J Cell Sci, 2016, 129 (8):1531-1536

[2] Woś M, Bendorowicz-Pikuła J. Participation of annexins in endocytosis and EGFR-mediated signal transduction [J]. Postepy Biochem, 2014, 60(1):55-61

[3] Laham N, Rotem-Yehudar R, Shechter C, et al. Transferrin corrected receptor association and endosomal localization of soluble HFE are not sufficient for regulation of cellular iron homeostasis [J]. J Cell Biochem, 2004, 91(6): 1130-1145

[4] Zhang Y, Xiang J, Liu Y, et al. Constructing transferrin receptor targeted drug delivery system by using doxorubicin hydrochloride and vanadocene dichloride [J]. Bioorg Med Chem Lett, 2011, 21(19):5982-5986

[5] Mayle KM, Le AM, Kamei DT. The intracellular trafficking pathway of transferrin [J]. Biochim Biophys Acta, 2012, 1820(3):264-281

[6] Hicke L. A new ticket for entry into budding vesicles-ubiq-

- uitin[J]. *Cell*, 2001, 106(5):527-530
- [7] Mosesson Y, Yarden Y. Monoubiquitylation: a recurrent theme in membrane protein transport[J]. *Isr Med Assoc J*, 2006, 8(4):233-237
- [8] Foot N, Henshall T, Kumar S. Ubiquitination and the regulation of membrane proteins [J]. *Physiol Rev*, 2017, 97(1):253-281
- [9] Piper RC, Luzio JP. Ubiquitin-dependent sorting of integral membrane proteins for degradation in lysosomes [J]. *Curr Opin Cell Biol*, 2007, 19(4):459-465
- [10] Hurley JH. ESCRT complexes and the biogenesis of multivesicular bodies[J]. *Curr Opin Cell Biol*, 2008, 20(1):4-11
- [11] Winter V, Hauser MT. Exploring the ESCRTing machinery in eukaryotes [J]. *Trends Plant Sci*, 2006, 11(3):115-123
- [12] Baiady N, Padala P, Mashahreh B, et al. The Vps27/Hrs/STAM (VHS) domain of the signal-transducing adaptor molecule (STAM) directs associated molecule with the SH3 domain of STAM(AMSH) specificity to longer ubiquitin chains and dictates the position of cleavage [J]. *J Biol Chem*, 2016, 291(4):2033-2042
- [13] Bache KG, Raiborg C, Mehlum A, et al. STAM and Hrs are subunits of a multivalent ubiquitin-binding complex on early endosomes [J]. *J Biol Chem*, 2003, 278(14):12513-12521
- [14] Jovic M, Sharma M, Rahajeng J, et al. The early endosome: a busy sorting station for proteins at the crossroads [J]. *Histol Histopathol*, 2010, 25(1):99-112
- [15] Saha N, Dutta S, Datta SP, et al. The minimal ESCRT machinery of *Giardia lamblia* has altered inter-subunit interactions within the ESCRT- II and ESCRT- III complexes [J]. *Eur J Cell Biol*, 2018, 97(1):44-62
- [16] Raiborg C, Stenmark H. The ESCRT machinery in endosomal sorting of ubiquitylated membrane proteins [J]. *Nature*, 2009, 458(7237):445-452
- [17] Schuh AL, Audhya A. The ESCRT machinery: from the plasma membrane to endosomes and back again [J]. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 2014, 49(3):242-261
- [18] Henne WM, Buchkovich NJ, Emr SD, et al. The ESCRT pathway [J]. *Dev Cell*, 2011, 21(1):77-91
- [19] Schöneberg J, Lee IH, Iwasa JH, et al. Reverse-topology membrane scission by the ESCRT proteins [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2017, 18(1):5-17
- [20] 李娜, 刘宁生. Tom1L1在细胞信号转导及受体内吞中的研究进展[J]. *中国细胞生物学学报*, 2014, 36(6):836-840
- [21] Kobayashi H, Tanaka N, Asao H, et al. Hrs, a mammalian master molecule in vesicular transport and protein sorting, suppresses the degradation of ESCRT proteins signal transduction adaptor molecule 1 and 2 [J]. *J Biol Chem*, 2005, 280(11):10468-10477
- [22] Lu R, Drubin DG, Sun Y. Clathrin-mediated endocytosis in budding yeast at a glance [J]. *J Cell Sci*, 2016, 129(8):1531-1536
- [23] Raiborg C, Bache KG, Gillooly DJ, et al. Hrs sorts ubiquitinated proteins into clathrin-coated microdomains of early endosomes [J]. *Nat Cell Biol*, 2002, 4(5):394-398
- [24] 陈季武, 郑丽娜, 王帮正, 等. 泛素化介导的非蛋白质降解功能 [J]. *生物化学与生物物理进展*, 2012, 39(7):613-621
- [25] Wang T, Liu NS, Seet LF, et al. The emerging role of VHS domain-containing Tom1, Tom1L1 and Tom1L2 in membrane trafficking [J]. *Traffic*, 2010, 11(9):1119-1128
- [26] Puertollano R. Interactions of TOM1L1 with the multivesicular body sorting machinery [J]. *J Biol Chem*, 2005, 280(10):9258-9264

[收稿日期] 2017-11-14

(上接第902页)

- and AMPK as prognostic biomarkers for breast cancer [J]. *Breast*, 2016, 30(1):39-46
- [16] von Eyben FE, Liu FJ, Amato RJ, et al. Lactate dehydrogenase isoenzyme 1 is the most important LD isoenzyme in patients with testicular germ cell tumor [J]. *Acta Oncol*, 2000, 39(4):509-517
- [17] de Haas T, Hasselt N, Troost D, et al. Molecular risk stratification of medulloblastoma patients based on immunohistochemical analysis of MYC, LDHB, and CCNB1 expression [J]. *Clin Cancer Res*, 2008, 14(13):4154-4160
- [18] Koh YW, Lee SJ, Park SY. Prognostic significance of lactate dehydrogenase B according to histologic type of non-small-cell lung cancer and its association with serum lactate dehydrogenase [J]. *Pathol Res Pract*, 2017, 213(9):1134-1138
- [19] Liberti MV, Locasale JW. The Warburg effect: how does it benefit cancer cells? [J]. *Trends Biochem Sci*, 2016, 41(3):211-218
- [20] Mitsuhashi A, Uehara T, Hanawa S, et al. Prospective evaluation of abnormal glucose metabolism and insulin resistance in patients with atypical endometrial hyperplasia and endometrial cancer [J]. *Support Care Cancer*, 2017, 25(5):1495-1501

[收稿日期] 2017-12-23