

糖原合酶激酶-3 β 对蛋白磷酸酯酶 2A 甲基化的调节

杨日云,金晓霞,刘 飞*

(南通大学神经再生重点实验室,江苏 南通 226001)

[摘要] 目的:研究磷脂酰肌醇 3-激酶(phosphoinositide 3-kinases,PI3K)信号通路及其中重要组分糖原合酶激酶-3 β (glycogen synthase kinase-3 β ,GSK-3 β)对蛋白磷酸酯酶 2A(protein phosphatase 2A,PP2A)甲基化修饰的调节。方法:用分子生物学及药理学手段改变 HepG2 和 HEK-293T 细胞中 PI3K 信号通路及此通路中重要分子 GSK-3 β 的活性,用 Western blots 分析 PI3K 信号通路及 GSK-3 β 活性改变对 PP2A 的催化亚基-C 亚基(catalytic subunit C, PP2A-C)甲基化修饰的影响。采用 GST-pull down 探讨 PP2A-C 特异性的亮氨酸甲基转移酶(leucine carboxyl methyltransferase-1, LCMT-1)与 GSK-3 β 之间是否存在相互作用。结果:用 LY294002 下调细胞的 PI3K 信号通路,促进 PP2A-C 的甲基化。用 GSK-3 β 抑制剂 AR-A014418 处理细胞抑制 PP2A-C 的甲基化。GSK-3 β 的 GST 融合蛋白 GST-GSK-3 β 可以 pull down LCMT-1。结论:PI3K 信号通路参与 PP2A 催化亚基甲基化的调节,抑制 GSK-3 β 减少 PP2A-C 的甲基化修饰。GSK-3 β 与 LCMT-1 存在相互作用,GSK-3 β 可能通过 LCMT-1,调节 PP2A-C 的甲基化修饰,进而影响 PP2A 的活性。

[关键词] PP2A;PI3K;GSK-3 β ;LCMT-1

[中图分类号] R329.26

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2014)12-1632-06

doi: 10.7655/NYDXBNS20141202

Glycogen synthase kinase-3 β regulates protein phosphatase 2A methylation

Yang Riyun, Jin Xiaoxia, Liu Fei*

(Jiangsu Key Laboratory of Neuroregeneration, Nantong University, Nantong 226001, China)

[Abstract] **Objective:** To determine whether and how glycogen synthase kinase-3 β (GSK-3 β), an important component of phosphoinositide 3-kinases(PI3K) signaling pathway, regulates the methylation of protein phosphatase 2A(PP2A). **Methods:** By using molecular biological and pharmacological approaches to alter the activity of PI3K signaling pathway and its key molecule, GSK-3 β , we investigated the regulation of PI3K pathway and GSK-3 β on PP2A methylation by using Western blot analysis in cultured HepG2 and HEK-293T cells. By using GST-pull down, we determined the interaction between LCMT-1 and GSK-3. **Results:** We found that inhibition of PI3K pathway by PI3K inhibitor LY294002 increased the methylation level of PP2A catalytic subunit. In addition, inhibition of GSK-3 β in cells led to the less methylation of PP2A catalytic subunit. We found that GST-GSK-3 β could pull-down LCMT-1. **Conclusion:** PI3K signaling pathway is involved in the regulation of PP2A catalytic subunit methylation. Inhibition of GSK-3 β suppresses the methylation. GSK-3 β has a mutual effect with LCMT-1 and may regulate the methylation of PP2A through LCMT-1.

[Key words] PP2A;PI3K;GSK-3 β ;LCMT-1

[Acta Univ Med Nanjing, 2014, 34(12): 1632-1637]

蛋白磷酸酯酶 2A (protein phosphatase 2A, PP2A)是最重要的催化 tau 蛋白去磷酸化的磷酸酯酶。tau 蛋白是主要存在于神经细胞中的一种微管相关蛋白,其主要生物学功能是刺激微管的组装和稳定微管的结构^[1]。PP2A 是由催化亚基-C 亚基

(catalytic subunit C, PP2A-C) 和结构亚基-A 亚基(scaffolding subunit A, PR65)先形成核心酶(PP2A core enzyme, PP2A-D),然后再和各种调节亚基-B 亚基(regulatory subunit B)组成异三聚体复合物-PP2A 全酶(PP2A heterotrimeric holoenzyme, PP2A-T)^[2-3]。其催化亚基羧基端的 309 亮氨酸残基可被特异的甲基转移酶(leucine carboxyl methyltransferase-1, LCMT-1)甲基化,也可以被特异的甲酯酶

[基金项目] 国家自然科学基金(30770468)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: feiliu@163.com

(protein phosphatase methylesterase, PME-1)去甲基化。PP2A 的甲基化并未改变催化亚基的催化活性,但是通过影响其亚基组成而改变了其结合底物的特异性,甲基化使得调节亚基更有效地结合在 PP2A 核心酶上,从而可以结合 tau 蛋白,并使其去磷酸化^[4-5]。糖原合酶激酶 3 β (glycogen synthase kinase-3 β , GSK-3 β) 是最重要的催化 tau 蛋白磷酸化的蛋白激酶之一,它可催化 tau 蛋白上多个丝氨酸或苏氨酸位点的磷酸化^[6]。GSK-3 β 的活性受磷酸化调节,GSK-3 β 第 9 位点的丝氨酸(Ser9)的磷酸化水平直接影响其激酶活性,该位点的磷酸化水平越高则 GSK-3 β 的激酶活性越低。Ser9 的磷酸化主要受磷脂酰肌醇 3-激酶 (phosphoinositide 3-kinases, PI3K)通路中的关键分子蛋白激酶 B(protein kinase B, AKT)调控^[7]。PI3K 信号通路的激活使得 Ser9 的磷酸化水平增加,表现为降低 GSK-3 β 的活性。

因此,提示 PI3K 信号通路及其重要组分 GSK-3 β 是否调节 PP2A 甲基化呢?本研究从细胞及分子水平,探讨了 PI3K 是否及如何调节 PP2A 的甲基化。结果发现 PI3K 信号通路中的 GSK-3 β 与 LCMT-1 相互作用,从而影响 PP2A 的甲基化。

1 材料与方 法

1.1 材 料

HepG2 细胞、HEK-293T 细胞株(人胚肾细胞)本实验室冷冻保存。

pGEX-6p-1 (Amarsham)及其余涉及质粒由本实验室保存;澳洲胎牛血清、DMEM 高糖液体培养基(Gibco 公司,美国);Lipofectamine 2000(Invitrogen 公司,美国);谷胱甘肽交联的琼脂糖凝胶珠子(Pierce 公司,美国);RC-DC Protein Assay (Bio-Rad 公司,美国);Protease Inhibitor Cocktail:complete, Mini, EDTA-free (Roche 公司,瑞士);Mouse anti-GST、Mouse anti-HA、LY294002、AR-A014418、 β -巯基乙醇(Sigma 公司,美国);Mouse anti-dm-PP2A-C、Mouse anti-GAPDH(Santa Cruz 公司,美国);Mouse anti-PP2A-C(BD 公司,美国);Rabbit anti-GSK-3 β 、Rabbit anti-AKT、Mouse anti-phosphorylated Ser9 GSK-3 β 、Mouse anti-phosphorylated Ser473 AKT (Cell Signaling 公司,美国);HRP conjugated goat anti mouse IgG、HRP conjugated goat anti rabbit IgG (Pierce 公司,美国);细胞裂解液(杭州碧云天公司);Western blot 化学发光检测试剂(Thermo 公司,美国)。

1.2 方 法

1.2.1 细胞培养和药物处理

HEK293-T、HepG2 细胞培养在含有 10%的澳洲胎牛血清的高糖 DMEM 培养基中,每 3 d 进行 1 次传代。将 HepG2 细胞接种于 12 孔板,用 LY294002 (40 μ mol/L)分别处理细胞 3 h;将 HEK-293T 细胞接种于 12 孔板,用 AR-A014418 (20 μ mol/L)处理细胞 4 h,然后分别加入含 10% β -巯基乙醇的 SDS 上样缓冲液,95 $^{\circ}$ C 煮 5 min,13 000 g 离心 5 min,此样品将用 Western blots 进行检测分析。

1.2.2 真核细胞转染

转染前 1 d 将 HEK-293T 细胞接种于 6 孔板。按 lipofectamine 2000 说明书进行转染,转染 pCI/HA-LCMT-1。48 h 后,用细胞裂解液收细胞。

1.2.3 蛋白质免疫印迹

RC-DC Protein Assay (Bio-Rad 公司,美国)进行蛋白定量,取等量蛋白(30 μ g)进行 SDS-PAGE 电泳分离。配置 10% SDS-PAGE,上样,电压上层胶 90 V、下层胶 110 V,电泳。电泳结束后使用湿转法将胶上的蛋白样品转移至 PVDF 膜,电流 350 mA,将转膜槽置于冰中 2 h。转膜结束后,将 PVDF 膜放入含有 10%脱脂奶粉的 TBS 中室温下封闭 2 h。分别加入含有 10%脱脂奶粉的 TBS 配置的一抗(Rabbit anti-GSK-3 β 、Rabbit anti-AKT 的稀释度为 1:2 000;Mouse anti-PP2A-C、Mouse anti-phosphorylated Ser9 GSK-3 β 、Mouse anti-phosphorylated Ser473 AKT、Mouse anti-GAPDH、Mouse anti-GST、Mouse anti-HA 的稀释度均为 1:1 000;Mouse anti-dm-PP2A-C 的稀释度为 1:500),4 $^{\circ}$ C湿盒中过夜。TBS-T 漂洗 15 min \times 3 次,TBS 漂洗 15 min \times 1 次。加入用含有 10%脱脂奶粉 TBS 配置的二抗 HRP conjugated goat anti mouse IgG 或 HRP conjugated goat anti rabbit IgG(稀释为 1:2 000),常温孵育 2 h。TBS-T 漂洗 15 min \times 3 次,TBS 漂洗 15 min \times 1 次,将膜置于 ECL 显色液中(临用前 A、B 液等体积混匀),室温 1 min。压片、曝光、显影。

1.2.4 GST-Pull down Assay

1.2.4.1 pGEX-6P-1/GSK-3 β 和 pGEX-6P-1 的原核表达

用 pGEX-6P-1/GSK-3 β 和空白对照 pGEX-6P-1 转化感受态细菌 BL21(由于 pGEX-6P-1 带 GST 标签,以下写作 GST)。第 2 天挑单克隆菌斑,至 5 ml LB (含氨苄抗生素 100 μ g/ml) 中 37 $^{\circ}$ C 摇床中培养过夜。第 3 天 1:100 比例稀释过夜菌,将 1 ml 菌液加

入到含 100 ml LB 培养基的 250 ml 灭菌锥形瓶中, 37℃ 振荡培养 2~3 h, 测 600 nm 处光密度值, 直至光密度值为 0.6 左右。加入诱导剂 IPTG 至终浓度为 0.5 mmol/L, 16℃ 摇床振荡培养过夜。第 4 天收集菌液, 8 000 g 离心 5 min 收获沉淀。各加入含 protease inhibition cocktail 的 PBS 5 ml 重悬, 混匀, 冰上超声使细胞完全破裂, 12 000 g 离心 15 min, 吸上清。用 RC-DC Protein Assay 进行蛋白定量, 冻存于 -80℃ 备用。各取诱导前后的菌液样品分别加入含 10% β-巯基乙醇的 SDS 上样缓冲液, 95℃ 煮 5 min, 13 000 g 离心 5 min。用抗 GST 的抗体检测诱导表达的情况。

1.2.4.2 谷胱甘肽交联的琼脂糖凝胶亲和纯化 GST 和 GST-GSK-3β

取 50% 谷胱甘肽交联的琼脂糖凝胶珠子 100 μl, 加入 1 ml 预冷 PBS, 漂洗 3 次。将漂洗后的 50% 谷胱甘肽交联的琼脂糖凝胶珠子加入到 500 μl 的之前诱导表达出的蛋白中, 4℃ 旋转过夜。4℃ 2 000 g 离心 2 min, 弃上清, 收集珠子用冰预冷的 1 ml PBS (含 protease inhibition cocktail) 清洗 3 遍。用等体积的 PBS 悬浮, 置于 4℃ 备用。为检测珠子上结合蛋白的情况, 取 10 μl 珠子, 加等体积含 10% β-巯基乙醇的 2×SDS 上样缓冲液, 95℃ 煮 5 min, 13 000 g 离心 5 min。Western blots 检测 GST 和 GST-GSK-3β 纯化情况。

1.2.4.3 GST-GSK-3β 纯化的融合蛋白从转染 HA-LCMT-1 的细胞裂解液中 pul down LCMT-1

pCI/HA-LCMT-1 转染 HEK-293T 细胞 48 h 后, 预冷的 PBS 洗细胞 3 次, 用细胞刮刮取细胞, 6 000 g 4℃ 离心 4 min, 弃上清, 加入细胞裂解液。冰上超声, 至液体透明。4℃ 13 000 g 离心 5 min, 收集上清。用 RC-DC Protein Assay 进行蛋白定量, 冻于 -80℃ 备用。

将之前已结合了 GST 和 GST-GSK-3β 的谷胱甘肽交联的琼脂糖凝胶珠子加入细胞裂解液, 4℃ 旋转 4 h。4℃ 2 000 g 离心 2 min, 弃上清, 收集珠子。PBS 清洗谷胱甘肽琼脂糖珠子 6 次。加含 10% β-巯基乙醇的 SDS 上样缓冲液, 95℃ 煮 5 min, 13 000 g 离心 5 min。用 HA 抗体 Western blot 检测 LCMT-1 是否可以被 GST-GSK-3β 或 GST pull down。

1.3 统计学方法

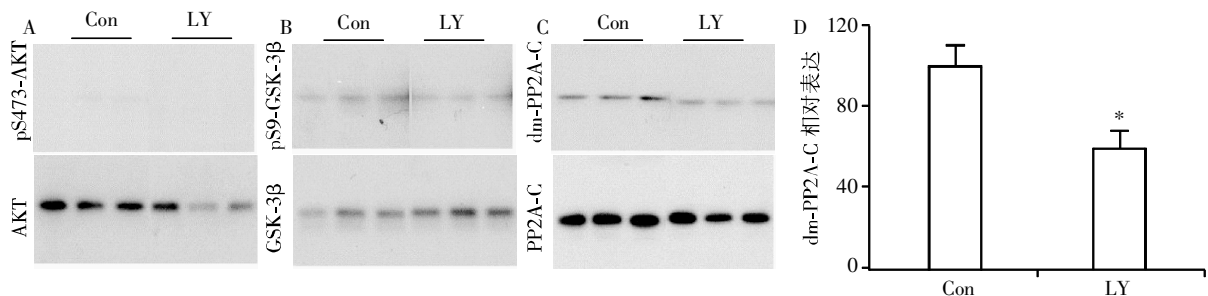
采用 SPSS 13.0 统计软件, 计量数据以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 免疫印迹检测蛋白水平变化的数据用两个独立样本 *t* 检测, $P \leq 0.05$ 表示有统计学差异。每组实验独立重复 3 次或以上。

2 结果

2.1 PI3K 信号通路的抑制, 促进 PP2A-C 的甲基化修饰

为研究 PI3K 信号通路是否参与调节 PP2A-C 的甲基化修饰, 在培养的 HepG2 细胞中, 用特异性 PI3K 抑制剂 LY294002 (40 μmol/L) 处理细胞 3 h, 然后用 Western blot 检测了 PI3K 信号通路分子 AKT 和 GSK-3β 的磷酸化水平以及 PP2A-C 的甲基化水平。结果显示, PI3K 抑制剂处理, 明显抑制 AKT 的磷酸化水平 ($P < 0.05, n \geq 3$, 图 1A), 也使得其磷酸化 GSK-3β 的能力下降, Ser9 的磷酸化水平明显降低 ($P < 0.05, n \geq 3$, 图 1B)。

为研究 PI3K 抑制剂 LY294002 处理对 PP2A-C 的甲基化的影响, 用特异性去甲基化 PP2A-C 的抗体, 检测 PP2A-C 的甲基化。结果发现, LY294002 处理细胞, 明显地使得去甲基化的 PP2A-C (demethylated PP2A-C, dm-PP2A-C) 水平降低, 也即甲基化的 PP2A-C 水平明显增加 ($P < 0.05, n \geq 3$, 图 1C、D)。这一结果显示 PI3K 信号通路参与 PP2A-C 甲基化的调



HepG2 细胞用 40 μmol/L LY294002 处理细胞 3 h, 然后用上样缓冲液裂解细胞。A: AKT 磷酸化; B: GSK-3β 的磷酸化; C: 去甲基化的 PP2A-C (dm-PP2A-C) 和总的 PP2A-C 水平; D: 图中的 dm-PP2A-C 经灰度扫描后, 用总 PP2A-C 的水平校正后的相对 dm-PP2A-C 水平。Con: 对照组, LY: LY294002 处理组; 与对照组相比, * $P < 0.05 (n \geq 3)$ 。

图 1 Western blot PI3K 信号通路调节 PP2A-C 的甲基化

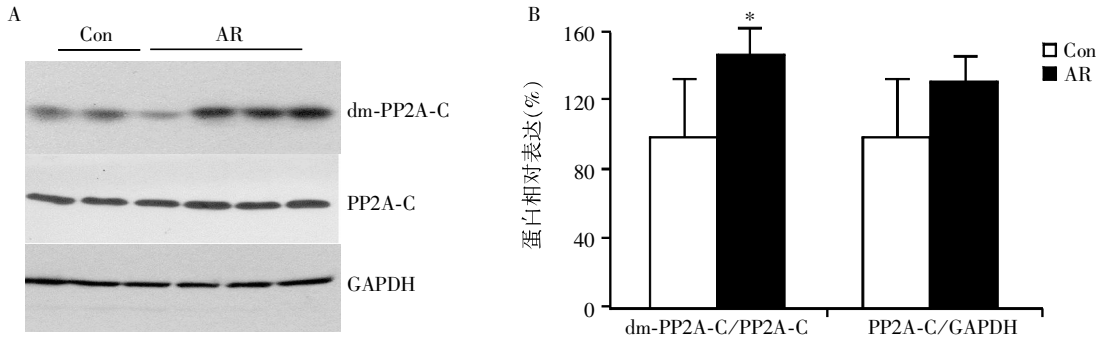
Figure 1 PI3K signaling pathway regulates the methylation of PP2A-C

节。PI3K 信号通路的抑制减少去甲基化 PP2A-C 的水平,即增加 PP2A-C 的甲基化。

2.2 抑制 GSK-3 β 降低 PP2A-C 的甲基化水平

GSK-3 β 是 PI3K 信号通路的重要分子,它催化多种底物分子的磷酸化,参与细胞多种生命活动的调节。为探究 PI3K 信号通路是否通过 GSK-3 β 影响 PP2A-C 的甲基化修饰,用 GSK-3 β 的抑制剂

AR-A014418(20 μ mol/L)处理 HEK-293T 细胞,4 h 后收集细胞,用 Western blots 来分析去甲基化的 PP2A-C 的水平。结果表明当用 AR-A014418 处理细胞后,细胞内的去甲基化 PP2A-C 表达量明显升高,但 PP2A-C 的表达水平没有明显变化 ($P < 0.05, n \geq 3$,图 2)。这结果说明 GSK-3 β 调节 PP2A-C 的甲基化,PI3K 通路可能通过 GSK-3 β 影响 PP2A-C 的甲



Con:对照组;AR:AR-A014418 处理组。与对照组相比,* $P < 0.05(n \geq 3)$ 。

图 2 Western blot 检测 GSK-3 β 抑制剂 AR-A014418 处理细胞减少 PP2A-C 甲基化修饰

Figure 2 Cells treated with GSK-3 β inhibitor AR-A014418 could reduce the methylation of PP2A-C

基化。

2.3 GSK-3 β 可以 pull down LCMT-1

为研究 PI3K 信号通路中的 GSK-3 β 是否通过 LCMT-1 调节 PP2A-C 的甲基化修饰。研究了 GSK-3 β 与 LCMT-1 之间是否存在相互关系,这是 GSK-3 β 调节 PP2A-C 甲基化的先决条件。

首先,在大肠杆菌 BL21 中表达出 GSK-3 β 和 GST 的融合蛋白 GST-GSK-3 β (图 3)。利用可以特异性吸附 GST 的谷胱甘肽琼脂糖珠子纯化出 GST-GSK-3 β 和 GST 的融合蛋白(图 4),并用纯化的未洗脱的 GST-GSK-3 β 或 GST 分别与过表达带 HA 标签的 LCMT-1 的细胞裂解液在 4 $^{\circ}$ C 孵育,在充分洗去非特异结合的蛋白质后,用 Western blot 检测被 GST 融合蛋白 pull down 的蛋白中是否含有 LCMT-1。结果显示,GST-GSK-3 β 可以从过表达 HA-LCMT-1 的细胞裂解液中 pull down LCMT-1(图 5),而 GST 本身则不能 pull down。这些结果表明 GSK-3 β 和 LCMT-1 之间可能存在相互作用。

3 讨论

PP2A 是一种主要的丝氨酸/苏氨酸磷酸酶,它调节许多细胞进程,包括调节信号转导途径及细胞周期,DNA 复制、转录和翻译^[8]。人脑内 70% tau 磷酸酶活性是由 PP2A 引起的^[1]。PP2A-C 受特异性的 LCMT-1 和 PME-1 对其催化亚基 C 保守区域的羧

基最末端亮氨酸 309 位点进行可逆的甲基化修饰,这种羧基端的甲基化修饰在丝氨酸/苏氨酸蛋白磷酸酶的 PPP 家族中是非常普遍的并且具有高度保守性,该甲基化修饰很有可能与细胞的生命活动有着密切地联系^[9-10]。近几年,国内外越来越多的学者将目标投向了羧基最末端亮氨酸 309 位点的甲基化修饰与 PP2A-C 活性升高之间的关系。有文献报道甲基化使得 PP2A-C 的活性升高^[11-13]。在本实验中,主要研究了 PP2A 特异性的 LCMT-1。

PI3K 家族在生命活动中的多条信号通路中起重要作用,从而对细胞各种生理活动进行相应的调节。在正常的生理条件下,由 PI3K 激活可以产生

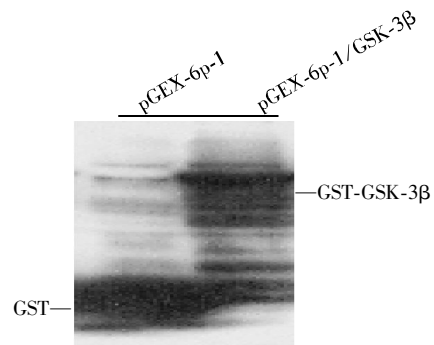
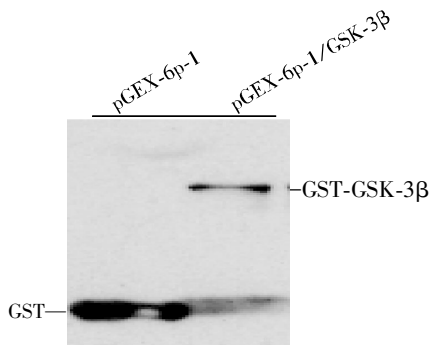


图 3 Western blot 用 anti-GST 抗体检测 pGEX-6p-1 和 pGEX-6p-1/GSK-3 β 在 BL21 大肠杆菌中的诱导表达

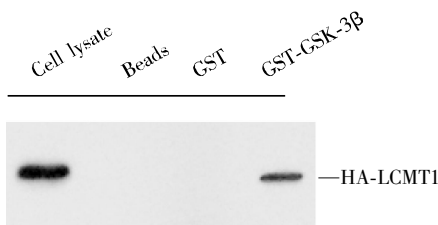
Figure 3 The expression of pGEX-6p-1 and pGEX-6p-1/GSK-3 β was induced in BL21



用谷胱甘肽交联的琼脂糖凝胶亲和纯化 GST 和 GST-GSK-3 β ,用抗 GST 抗体检测纯化蛋白。

图 4 纯化的 GST 和 GST-GSK-3 β 蛋白印迹分析

Figure 4 Western blot analysis of the purified GST and GST-GSK-3 β



将过表达 pCI/HA-LCMT-1 的细胞裂解液与结合于谷胱甘肽交联的琼脂糖球珠上的 GST-GSK-3 β 和 GST 分别孵育,在充分洗去非特异结合的蛋白质后,用 Western blot 检测被 pull down 的蛋白质中是否含有 LCMT-1。所用抗体为 anti-HA。图中 Beads 为直接在过表达 HA-LCMT-1 的细胞裂解液中加入未结合融合蛋白的谷胱甘肽琼脂糖珠子的样品。

图 5 Western blot 检测 GST-GSK-3 β 从过表达 pCI/HA-LCMT-1 的细胞裂解液中 pull down LCMT-1

Figure 5 GST-GSK-3 β can pull down LCMT-1 from the cell lysate of pCI/HA-LCMT-1 overexpression, but GST can not pull down LCMT-1

两种产物,分别为类脂产物 3,4-二磷酸磷脂酰肌醇和 3,4,5-三磷酸磷脂酰肌醇,这 2 种产物可以作为第二信使与细胞内的多种靶蛋白进行结合,从而激活这些靶蛋白,进而在细胞内形成信号级联复合物逐渐将信号放大,最终参与调节多种重要的生命活动包括细胞增殖、分化、存活和迁移等^[14]。PI3K 信号通路的下游分子 3-磷酸肌醇依赖性蛋白激酶-1 可以磷酸化 AKT,从而引起 AKT 的激活,活化的 AKT 会导致其下游分子 GSK-3 β 的 Ser9 残基的磷酸化,从而使 GSK-3 β 的活性降低^[15]。GSK-3 β 是最初发现的 tau 相关激酶。早期的研究表明,在非神经元细胞中共转染 tau 和 GSK-3 β 会引起 tau 的许多位点磷酸化水平的明显升高^[16]。有研究者发现利用渥曼青霉素抑制大鼠脑内的 PI3K 可以激活海马区 GSK-3 β 的活性,并引起 tau 的异常磷酸化^[17]。

这些证据表明 GSK-3 β 是 tau 的一个关键激酶。

GSK-3 β 与 PP2A 是一对起拮抗作用的调节 tau 磷酸化的酶。有研究表明,当干扰 PI3K 信号通路会潜在地影响 PP2A 介导的 tau 蛋白的磷酸化。PP2A 可以使 GSK-3 β 脱磷酸化,从而使 GSK-3 β 的活性升高^[18]。PP2A 和 GSK-3 β 之间的协同调节似乎保证着 tau 蛋白在相应位点的磷酸化水平的平衡。本研究发现,当用 PI3K 的抑制剂 LY294002 处理细胞时,细胞内脱甲基化的 PP2A-C 的表达量明显降低。于是假设 PI3K 信号通路的下游分子 GSK-3 β 可能与 PP2A 的甲基化修饰有一定联系。本研究用抑制剂抑制 GSK-3 β 活性,证明了该假设:GSK-3 β 可能对 PP2A 的甲基化修饰有影响。

PP2A 催化亚基 C 保守区域 309 亮氨酸残基可被特异的 LCMT-1 甲基化,而本实验结果显示 GSK-3 β 可能对 PP2A 的甲基化修饰有影响。因此,提示 GSK-3 β 可能与 LCMT-1 存在相互做用。蛋白质相互作用的常规研究方法包括 GST-pull down、免疫共沉淀(CO-IP)、免疫细胞荧光共定位、酵母双杂交技术等。在本研究中,主要使用了 GST-pull down 这种经典的方法来探究 GSK-3 β 和 LCMT-1 之间是否存在相互作用。实验结果显示 GSK-3 β 和 LCMT-1 之间可能存在生理上的相互作用(图 3~5)。

因此,本文得出 PI3K 信号通路可能通过下游分子 GSK-3 β 来影响 LCMT-1 所催化的 PP2A 的甲基化。但是具体 GSK-3 β 是对 LCMT-1 的哪些位点有影响仍需要进一步的研究证实。

[参考文献]

- [1] Song B, Ao Q, Wang Z, et al. Phosphorylation of tau protein over time in rats subjected to transient brain ischemia[J]. *Neural Regen Res*, 2013, 8(34):3173-3182
- [2] Sontag JM, Sontag E. Protein phosphatase 2A dysfunction in Alzheimer's disease[J]. *Front Mol Neurosci*, 2014, 11(7):16
- [3] Hage Hassan R, Bourron O, Hajduch E. Protein phosphatase 2A: a highly regulated family of serine/threonine phosphatases implicated in cell growth and signaling[J]. *World J Diabetes*, 2014, 5(3):244-257
- [4] Longman MR, Ranieri A, Avkiran M, et al. Regulation of PP2A-C carboxylmethylat-ion and cellular localisation by inhibitory class G-protein coupled receptors in cardio myocytes[J]. *Plos One*, 2014, 9(1):86234
- [5] Laxman S, Sutter BM, Tu BP. Methionine is a signal of amino acid sufficiency that inhibits autophagy through the methylation of PP2A[J]. *Autophagy*, 2014, 10(2):

- 386-387
- [6] Zhang Q, Bhojani MS, Ben-Josef E, et al. Glycogen synthase kinase 3 β in pancreatic cancer and its implications in chemotherapy and radiation therapy[J]. *JC Arcinog Mutagen*, 2013, 4(3):147
- [7] Riar AK, Narasimhan M, Rathinam ML, et al. Ethanol- β induced transcriptional activation of programmed cell death 4(Pdcd4) is mediated by GSK-3 β signaling in Rat cortical neuroblasts[J]. *Plos One*, 2014, 9(5):98080
- [8] Gorjanacz M. Nuclear assembly as a target for anti-cancer therapies[J]. *Nucleus*, 2014, 5(1):47-55
- [9] MacKay KB, Tu Y, Young SG, et al. Circumventing embryonic lethality with Lcm-t-1 deficiency: generation of hypomorphic Lcm-t-1 mice with reduced protein phosphatase 2A methyltransferase expression and defects in insulin signaling [J]. *Plos One*, 2013, 8(6):65967
- [10] Ogris E, Du X, Nelson K C, et al. A protein phosphatase methyltransferase (PME-1) is one of several novel proteins stably associating with two inactive mutants of protein phosphatase 2A [J]. *Biol Chem*, 1999, 274(20):14382-14391
- [11] Longin S, Jordens J, Martens E, et al. An inactive protein phosphatase 2A population is associated with methyltransferase and can be reactivated by the phosphotyrosyl phosphatase activator[J]. *Biochem*, 2004, 380(1):111-119
- [12] Dou Z, Pan JA, Dbouk HA, et al. Class IA PI3K p110 β subunit promotes autophagy through Rab5 small GTPase in response to growth factor limitation[J]. *Mol Cell*, 2013, 50(1):29-42
- [13] Grimes CA, Jope RS. The multifaceted roles of glycogen synthase kinase 3 β in cellular signaling[J]. *Neurobiol*, 2001, 65(4):391-426
- [14] Lin L, Huang QX, Yang SS, et al. Melatonin in Alzheimer's disease[J]. *Int J Mol Sci*, 2013, 14(7):14575-14593
- [15] Zhang L, Zhang J, Dong Y, et al. The potential dual effects of sevoflurane on AKT GSK3 β signaling pathway [J]. *Med Gas Res*, 2014, 4(1):5
- [16] Xie X, Xu XM, Li N, et al. DMH1 increases glucose metabolism through activating Akt in L6 Rat skeletal muscle cells[J]. *Plos One*, 2014, 9(9):107776
- [17] Ali YO, Ruan K, Zhai RG. NMNAT suppresses tau-induced neurodegeneration by promoting clearance of hyperphosphorylated tau oligomers in a drosophila model of tauopathy[J]. *Hum Mol Genet*, 2012, 21(2):237-250
- [18] Goldbaum O, Oppermann M, Handschuh M, et al. Proteasome inhibition stabilizes tau inclusions in oligodendroglial cells that occur after treatment with okadaic acid[J]. *Neurosci*, 2003, 23(26):8872-8880
- [收稿日期] 2014-07-17

(上接第 1631 页)

- [8] Kleeberger W, Bova GS, Nielsen ME, et al. Roles for the stem cell associated intermediate filament Nestin in prostate cancer migration and metastasis[J]. *Cancer Res*, 2007, 67(19):9199-9206
- [9] Liu J, Brown RE. Immunohistochemical detection of epithelial-mesenchymal transition associated with stemness phenotype in anaplastic thyroid carcinoma[J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2010, 3(8):755-762
- [10] Doyle LA, Ross DD. Multidrug resistance mediated by the breast cancer resistance protein BCRP (ABCG2) [J]. *Oncogene*, 2003, 22(47):7340-7348
- [11] Oshikata A, Matsushita T, Ueoka R. Enhancement of drug efflux activity via MDR1 protein by spheroid culture of human hepatic cancer cells[J]. *J Biosci Bioeng*, 2011, 111(5):590-593
- [12] Zheng X, Cui D, Xu S, et al. Doxorubicin fails to eradicate cancer stem cells derived from anaplastic thyroid carcinoma cells; characterization of resistant cells [J]. *Int J Oncol*, 2010, 37(2):307-315
- [13] 张菡姣, 兰玲, 郑旭琴, 等. 甲状腺癌中类干细胞的侧群细胞的分离及鉴定[J]. *南京医科大学学报:自然科学版*, 2012, 32(5):585-591
- [14] Jin L, Chen J, Li L, et al. CRH suppressed TGF beta1-induced epithelial-mesenchymal transition via induction of E-cadherin in breast cancer cells[J]. *Cell Signal*, 2014, 26(4):757-765
- [15] Li K, He W, Lin N, et al. Downregulation of N-cadherin expression inhibits invasiveness, arrests cell cycle and induces cell apoptosis in esophageal squamous cell carcinoma[J]. *Cancer Investigation*, 2010, 28(5):479-486
- [16] Toiyama Y, Yasuda H, Saigusa S, et al. Increased expression of Slug and Vimentin as novel predictive biomarkers for lymph node metastasis and poor prognosis in colorectal cancer [J]. *Carcinogenesis*, 2013, 34(11):2548-2557
- [17] Hermann PC, Huber SL, Herrler T, et al. Distinct populations of cancer stem cells determine tumor growth and metastatic activity in human pancreatic cancer [J]. *Cell Stem Cell*, 2007, 1(3):313-323
- [收稿日期] 2014-07-19