

· 基础研究 ·

ORP8 与 SPAG5 相互作用并影响细胞周期 *

罗 玮 周天鸿 闫道广[△]

(暨南大学生命科学技术学院 广东 广州 510632)

摘要 目的: 筛选与氧化固醇结合蛋白相关蛋白 8 (Oxysterol binding protein related protein 8, ORP8) 相互作用的蛋白质, 为揭示 ORP8 在细胞中的功能及其机制提供线索, 并根据相互作用蛋白质初步探索 ORP8 的功能。方法: 构建重组诱饵质粒 pGBKT7-ORP8m, 利用 GAL4 酵母双杂交系统筛选人 Universal cDNA 文库, 筛选出与 ORP8 相互作用的蛋白质, 通过 GST Pull-down 以及免疫共沉淀 (Co-immunoprecipitation, Co-IP) 验证蛋白质相互作用, 并通过流式细胞仪检测过表达 ORP8 对 HepG2 细胞周期的影响。结果: 酵母双杂交筛选得到了精子相关抗原 5 (Homo sapiens sperm associated antigen 5, SPAG5), 体外 GST pull-down 和 Co-IP 实验确证了 ORP8-SPAG5 的相互作用, 流式细胞术显示 ORP8 过表达后与空载体相比, 人肝癌细胞系 HepG2 的 S 期细胞数增加, G1 期细胞数减少。结论: SPAG5 是与 ORP8 相互作用的蛋白质, ORP8 过表达影响人肝癌细胞系 HepG2 的细胞周期, 可能通过 SPAG5 起作用。ORP8-SPAG5 的相互作用为进一步研究 ORP8 在肝细胞中的功能及其机制提供了有用的线索

关键词 ORP8 酵母双杂交 SPAG5 蛋白质相互作用 细胞周期

中图分类号: Q548.1, Q78 文献标识码: A 文章编号: 1673-6273(2011)14-2601-04

Interaction of ORP8 with SPAG5 and Their Effects on Cell Cycle*

LUO Wei, ZHOU Tian-hong, YAN Dao-guang[△]

(College of Life Science and Technology, Jinan University, 510632, Guangzhou, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the function of oxysterol binding protein related protein 8 (ORP8) and to provide clues for better understanding its function and mechanism. **Methods:** Yeast two-hybrid system screening human universal cDNA library was used to obtain proteins interacting with ORP8. Putative interactions were further confirmed by GST Pull-down and Co-IP experiments. The effects of ORP8 on cell cycle were detected by flow cytometry in HepG2 cells. **Results:** ORP8 interacted with SPAG5 in two-hybrid screen using ORP8 as bait. ORP8-SPAG5 interaction was further confirmed in GST Pull-down and Co-IP experiments. Transient over-expression of ORP8 in HepG2 cells decreased cell population of G0/G1-phase and increased S-phase compared with that in control. **Conclusion:** ORP8 physically interact with SPAG5 and influence the cell cycle of HepG2 cell lines, probably through a mechanism involving SPAG5. ORP8-SPAG5 interaction provides clues to further explore the function of ORP8 and its mechanism.

Key words: ORP8; Yeast two hybrid; SPAG5; Protein interaction; Cell cycle

Chinese Library Classification (CLC): Q548.1, Q78 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2011)14-2601-04

前言

氧化固醇是胆固醇的二十七碳氧化产物或胆固醇生物合成的副产物。氧化固醇不仅是脂质代谢的中间产物, 近二十年来的研究发现氧化固醇具有多种生理活性, 影响细胞生物学的各个方面包括脂代谢、信号传导、免疫功能、细胞毒性等, 而这些功能是由特定的氧化固醇感受器蛋白介导的, 这些蛋白包括肝脏 X 受体 (LXR), 固醇调节元件结合蛋白 (Insig), 氧化固醇结合蛋白 (OSBP) 和氧化固醇结合蛋白相关蛋白家族 (OSBP-Related protein family, ORPs)^[1]。在人类中, 至少有 12 种 OSBP/ORPs 蛋白, 它们共同的结构特点是都具有氧化固醇的结合域^[2,3]。目前发现氧化固醇结合蛋白家族仅存在于真核生物中, 这些蛋白作为脂质传感器以及运载蛋白在囊泡运输、脂质

代谢和信号转导等方面发挥作用^[4-6]。

ORP8 (OSBP-Related Protein 8) 是氧化固醇结合蛋白相关蛋白家族的成员之一。研究显示, ORP8 在很多组织中都有表达, 在肝组织中高表达, ORP8 结合二十五羟基胆固醇, 以 C-末端锚定在内质网细胞膜上, 在 THP-1 细胞中抑制 ABCA1 的转录和胆固醇的流出, 参与脂质代谢的调控^[7]。

然而, 在 ORPs 家族中, ORP8 的功能及其发挥功能的机制仍属一个未被探索的领域, 为进一步了解 ORP8 功能及发挥功能的机制, 我们通过酵母双杂交筛选与 ORP8 相互作用的蛋白, 以期通过相互作用蛋白推导 ORP8 的功能及其起作用的机制, 本文报道 ORP8 与精子相关抗原 5 (SPAG5) 的相互作用及其对细胞周期的影响。

* 基金项目: 国家自然科学基金 (30971104)

作者简介: 罗玮 (1986-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 脂质生物学, 电话: 020-85223087

[△] 通讯作者: 闫道广, Email: tydg@jnu.edu.cn

(收稿日期: 2011-03-06 接受日期: 2011-03-29)

1 材料与方法

1.1 材料

Matchmaker GAL4 酵母双杂交系统和人 Universal Mate & Plate cDNA 文库 (normalized) 购自 Clontech 公司; 大肠杆菌 DH5 α 、RosettaTM (DE3)、酵母菌株 AH109、pcDNA4HismaxC-ORP8 质粒、各种用于构建表达载体的质粒和哺乳动物细胞系 HepG2 细胞株为本实验室保存; 限制性内切酶、连接酶购自大连 Takara 公司; PCR 清洁试剂盒、胶回收试剂盒、酵母质粒抽提试剂盒购自 OMEGA 公司; GST-bind resin 购自 Novagen 公司; Protein G sepharose 4 fast flow 购自 Invitrogen 公司; 一抗 Anti ORP8 抗体购自 Santacruz 公司, Anti-SPAG5 抗体购自 Proteintech Group 公司; 二抗 Goat anti rabbit-HRP 抗体和 Goat anti mouse-HRP 抗体购自 Bio-rad 公司; 胎牛血清购自杭州四季青公司; DMEM 购自 Gibco 公司; 转染试剂 Lipofectamine 2000 购自 Invitrogen 公司; 引物由 Invitrogen 公司合成。

1.2 方法

1.2.1 质粒构建 pGBKT7-ORP8m (ORP8m, NM_001003712, ORP8 全长除去 C 末端 19 个氨基酸的跨膜区): 上游引物: 5'-gatcattcatATGAGTCAGCGCCAAGGAAAAG-3'(下划线处为 NdeI 酶切位点) 下游引物: 5'-aatgtcgacGTCTTTTGTGCA-GAAAATAATCC-3'(下划线处为 SalI 酶切位点) 通过 PCR 扩增得到 ORP8m 序列, PCR 产物经 PCR 产物清洁及双酶切处理后, 克隆到 pGBKT7 载体上, 转化至 DH5 α , 挑选单克隆进行 PCR、双酶切鉴定后送公司测序。

pcDNA4HismaxC-SPAG5: 上游引物 5'-aatgtgaccATGTG-GCGAGTGAAAAAACT-3'(下划线处为 KpnI 酶切位点) 下游引物 5'-aatctcgagATTCTGGCTTTCAGTTTCTT-3'(下划线处为 XhoI 酶切位点), 通过 PCR 扩增得到 SPAG5 序列, PCR 产物经 PCR 产物清洁及双酶切处理后, 克隆到 pcDNA4HismaxC 载体上, 转化至 DH5 α , 挑选单克隆进行 PCR、双酶切鉴定后送公司测序。

pGEX-4T-1-ORP8m: 用于构建 pGBKT7-ORP8m 的 PCR 产物经 SalI 单酶切后, 回收 ORP8m 片段与 SmaI/XhoI 双酶切处理的 pGEX-4T-1 载体进行连接并转化 DH5 α , 挑选单克隆进行 PCR、双酶切鉴定。

1.2.2 酵母双杂交筛选 Universal Human cDNA Library 诱饵蛋白载体 pGBKT7-ORP8m 经检测, 在酵母 AH109 株中无毒、无自激活。将诱饵质粒 pGBKT7-ORP8m 转化 AH109, 划线—Trp 平板, 30℃ 培养 3 天, 转接单克隆至 50 ml SD/-Trp 液体培养基, 培养过夜后测定 O.D.600 达到 0.8, 离心去上清, 用 1.5 ml SD/-Trp 培养基重悬细胞。用 2X YPDA 培养基稀释文库, 预留 10 μ l 测定文库滴度。将重悬的细胞加入到 YPDA-文库混合液中, 并转至锥形瓶中 30℃ 低速震荡培养 20 h, 后显微镜下观察酵母菌是否形成三叉状合体, 离心收菌去上清, 用 3 ml YPDA 重悬, 取 10 μ l 菌体做 mating 效率测定。其余菌体按 50 μ l/板涂布于 SD/-Ade-His-Leu-Trp 筛选培养基上, 30℃ 恒温培养 14 天。14 天后挑取酵母克隆进行 β -半乳糖苷酶活性检测。将挑选出的阳性酵母克隆抽提质粒 DNA, 转化大肠杆菌 DH5 α 后, 送测序并用 NCBI BLAST 进行比对分析。

1.2.3 细胞培养及细胞转染 HepG2 细胞以含有 10% 胎牛血清、100 U/ml 青霉素、100 U/ml 链霉素的 DMEM 高糖培养基培养于 37℃、5% CO₂ 培养箱中。按照 Invitrogen 说明书, 6 孔板中每孔细胞用 2 μ g 质粒和 4 μ l Lipofectamine 2000 进行转染。

1.2.4 GST Pull-down 验证相互作用 原核表达 pGEX-4T-1、pGEX-4T-1-ORP8m 分别转化大肠杆菌 RosettaTM(DE3), 37℃ 培养至 O.D.600 达到 0.5~1.0, 加入 IPTG 至终浓度 0.1 mM, 20℃ 低温诱导 16~18 h, 5000 rpm 离心 5 min 收集菌体进行超声破碎, 10000 rpm 低温离心 10 min 留上清。

细胞裂解 HepG2 细胞用预冷 PBS 洗涤两次, 用细胞裂解液 (50 mM Tris-Cl, 150 mM NaCl, 1.0% Triton X-100, pH 8.0, 使用前添加蛋白酶抑制剂) 裂解, 冰上摇动 30 min, 12000 rpm 离心 10 min, 取上清。

树脂孵育: 菌体裂解上清各加入 30 μ l GST-bind resin, 冰上孵育 30 min, PBS 洗 3 次, 加入细胞裂解上清, 冰上孵育 3 h, 用细胞裂解液洗涤 3 次, 吸干残余液体, 加入 30 μ l 2X Sample Buffer, 98℃ 变性 5 min, 进行 SDS-PAGE, 并以 anti-SPAG5 抗体进行 Western blot 检测。

1.2.5 免疫共沉淀验证细胞内相互作用 细胞瞬时转染: 质粒 pcDNA4HismaxC-ORP8 和 pcDNA4hismaxC-SPAG5 用 Lipofectamine 2000 共同转染 HepG2 细胞。转染 24 小时后用细胞裂解液 (50 mM Tris-Cl, 150 mM NaCl, 10% glycerol, 0.5 mM MgCl₂, 0.5% TritonX-100, pH 8.0, 使用前添加蛋白酶抑制剂) 冰上裂解 45 min, 10000 Xg 离心 15 min 收集上清。取 30 μ l 上清, 加入 10 μ l 4X 蛋白电泳上样缓冲液, 98℃ 变性 5 min, 取适量进行 SDS-PAGE 电泳, 分别用 anti-ORP8 和 anti-SPAG5 抗体进行 Western blot 检测蛋白表达情况。

免疫共沉淀检测: 预吸附: 上清加入 30 μ l Protein G sepharose 4 fast flow 预吸附 1 h, 500 Xg 离心 5 min 收集上清。抗体结合: 上清均分为两部分, 分别加入 anti-ORP8 抗体和 control rabbit 抗体, 4℃ 摇动孵育过夜。树脂结合: 分别加入 30 μ l 树脂, 4℃ 摇动孵育 3 h。低速离心弃上清, 用细胞裂解液洗涤树脂 5 次。加入 30 μ l 2X SDS loading buffer, 98℃ 变性 5 min, 进行 SDS-PAGE。用 anti-SPAG5 抗体进行 Western blot 检测 Co-IP 结果。

1.2.6 细胞周期检测 流式细胞术分析细胞周期 样品(PI 染色)的制备: 将 pcDNA4HixmaxC 和 pcDNA4HixmaxC-ORP8 瞬时转染 HepG2。36 h 后用 0.25% 胰酶消化制成单细胞悬液, 然后 500 Xg 离心 5 min, 弃上清液。沉淀用 PBS 洗一次, 用 4℃ 预冷的 70% 冷乙醇固定, 4℃ 保存, 固定 18 h。调整细胞浓度为 106 个/mL, 取 1 mL 细胞悬液, 用 PBS 洗 3 次, 细胞重悬于 1 mL 碘丙啶(PI)染液中, 37℃ 孵育 30 min 后进行流式细胞术分析。PI 染液终浓度为 50 μ g/mL, RNase A 终浓度为 20 μ g/mL。

1.3 统计学处理

实验结果采用 SPSS13.0 软件分析。各分组所得计量数据采用均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{X}\pm S$) 表示, 两组间均数比较用 t 检验。P<0.05 有统计学意义。

2 结果

2.1 酵母双杂交筛选得到与 ORP8 相互作用的蛋白质

为了鉴定 ORP8 相互作用的蛋白质,为 ORP8 功能及其机制研究提供有用的线索,本研究利用 GAL4 酵母双杂交系统,以 ORP8(NM_001003712)为诱饵蛋白筛选具有广泛成人组织来源的 Universal Human cDNA Library。ORP8 C 末端有 19 个氨基酸的蛋白跨膜区,在酵母双杂交系统中跨膜区的存在会影响重组蛋白的核内定位及进一步的报道基因激活,因而在构建诱饵质粒时这一段序列去除^[7]。将生长在 SD/4- 筛选培养基上的酵母克隆经进一步β- 半乳糖苷酶活性检测,阳性克隆显蓝色,最终获得 9 个阳性克隆(图 1)。将这些克隆测序后进行序列比对,其中两个克隆(编号为 8-18 和 8-22,见图 1)为精子相关抗原 5 (NM_006461 Homo sapiens sperm associated antigen 5, SPAG5)。

2.2 GST pull-down 验证 ORP8 与 SPAG5 体外的相互作用

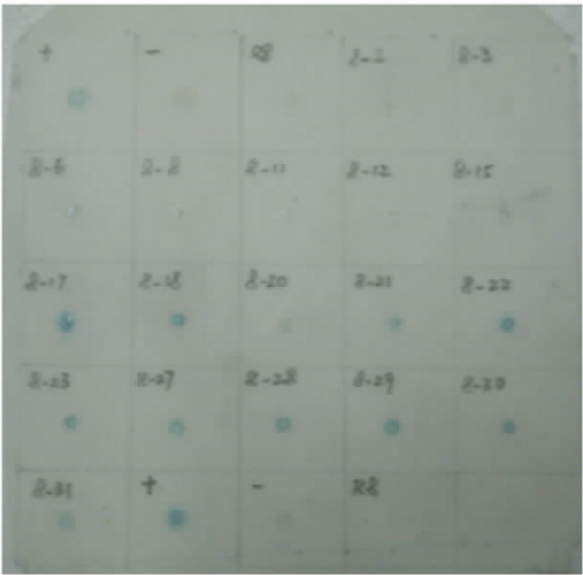


图 1 ORP8 文库筛选 SD/4- 平板上阳性克隆的β- 半乳糖苷酶活性检测 +: 阳性对照 -: 阴性对照 R8 :ORP8 文库筛选 SD/2- 平板上的阴性克隆 8-2 到 8-31 :ORP8 文库筛选 SD/4- 平板上的阳性克隆

Fig. 1 β-Galactosidase Assays of positive ORP8 colonies from SD/4- selection medium ;+: positive control; -: negative control; R8: random colonies on SD/2- plates; 8-2 to 8-31: positive colonies on SD/4- selection plates

为进一步确证 ORP8 与 SPAG5 的相互作用,我们进行体外 ORP8 与 SPAG5 的 GST Pull-down 实验。GST-ORP8m (ORP8m,ORP8 全长除去 C 末端 19 个氨基酸的跨膜区)在大肠杆菌表达纯化, HepG2 细胞裂解液作为 SPAG5 蛋白的来源。考马斯亮蓝染色结果显示, GST-ORP8 融合蛋白大小约为 120KD,与预测值 124KD(ORP8 本身为 97 KD,加上 GST 蛋白 27 KD)相近(图 2A)。GST Pull-down 样品利用多克隆 SPAG5 抗体进行 Western Blot 检测,结果显示与 GST 对照相比,结合了 GST-ORP8 的 Glutathione Sepharose 4B 可以特异将 SPAG5 蛋白共沉淀下来,表明 ORP8 与 SPAG5 在体外发生特异性的相互作用(图 2B)。

2.3 免疫共沉淀(Co-IP)验证 ORP8 与 SPAG5 在细胞内的相互

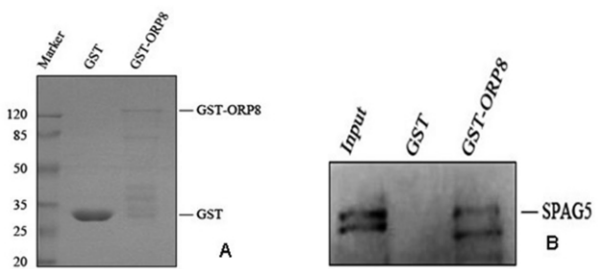


图 2 GST Pull-down 鉴定 ORP8 与 SPAG5 体外的相互作用:A 纯化 GST 和 GST-ORP8 蛋白考马斯亮蓝染色 B GST Pull-down 样品 Western blot 检测 SPAG5

Fig. 2 GST Pull-down assay of ORP8-SPAG5 interaction:A:Coomassie blue staining of purified GST and GST-ORP8m proteins; B:Western blotting analysis of SPAG5 in GST Pull-down samples.

作用

为进一步检测 ORP8 与 SPAG5 在细胞内的相互作用,进行免疫共沉淀(Co-IP)实验。在 HepG2 细胞同时过表达 ORP8 和 SPAG5,以 ORP8 兔多克隆抗体和对照兔多克隆抗体进行免疫沉淀,结果显示与对照抗体相比,ORP8 抗体可特异地将 SPAG5 共沉淀下来,表明 ORP8 与 SPAG5 在 HepG2 细胞中发生相互作用(图 3)。

2.4 ORP8 和 SPAG5 在 HepG2 细胞中的内源性表达

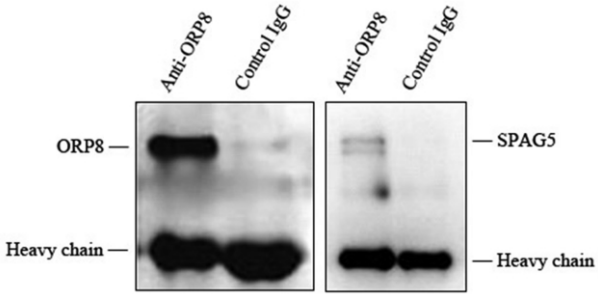


图 3 Co-IP 鉴定 ORP8 与 SPAG5 在 HepG2 细胞内的相互作用:左: ORP8 免疫沉淀样品 Western blot 检测 ORP8 ;右:ORP8 免疫沉淀样品 Western blot 检测 SPAG5

Fig. 3 Co-IP analysis of ORP8-SPAG5 interaction in HepG2 cells:(a) Western blotting analysis of ORP8 in ORP8 IP samples; (b) Western blotting analysis of SPAG5 in ORP8 IP samples

为了进一步研究 ORP8-SPAG5 相互作用是否影响 HepG2 细胞的功能,检测 ORP8 和 SPAG5 在 HepG2 细胞中的表达。Western blot 分析检测 ORP8 和 SPAG5 在 HepG2 细胞中的内源性表达,ORP8 的抗体来源及其特异性描述见文献^[7],结果显示 ORP8 与 SPAG5 在 HepG2 细胞中有内源性表达,且分子量与过表达的一致(图 3)。SPAG5 与 ORP8 在 HepG2 细胞中的内源性表达显示 ORP8-SPAG5 相互作用可能在 HepG2 细胞中发生并参与调节细胞功能。

2.5 ORP8 改变 HepG2 的细胞周期

SPAG5 是一个纺锤体结合蛋白,在有丝分裂过程中具有重要的调节作用,下调 SPAG5 表达的细胞其纺锤体会发生畸形,导致有丝分裂延迟,细胞停滞于 G2/M 期^[10,11],因此我们检

测 ORP8 是否对细胞周期造成影响。在 HepG2 细胞中 ,与空载体对照相比 ,ORP8 过表达使 G1 期细胞减少 ,G2/M 期细胞增多 ,说明 ORP8 的过表达可引起肝癌细胞系 HepG2 细胞周期改变(表 1)。

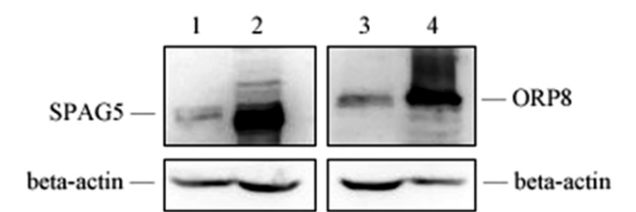


图 4 Western blotting 检测 ORP8 和 SPAG5 在 HepG2 细胞中的表达: 1: Western blotting 检测 SPAG5 的内源性表达 2 :Western blotting 检测 SPAG5 的过表达 3 :Western blotting 检测 ORP8 的内源性表达; 4: Western blotting 检测 ORP8 的过表达

Fig. 4 Endogenous expression of ORP8 and SPAG5 in HepG2 cell: 1: Western blotting detect SPAG5 endogenous expression; 2: Western blotting detect SPAG5 overexpression; 3: Western blotting detect ORP8 endogenous expression; 4: Western blotting detect ORP8 overexpression .

表 1 ORP8 过表达(ORP8 group)和对照(control group)的 HepG2 细胞周期($\bar{x} \pm s$)分析

Table 1 Analysis of cell cycle in HepG2 control and ORP8 overexpressing cells

Group	G1 (%)	G2/M (%)	S (%)
ORP8 group	52.9± 0.95*	14.33± 0.80*	33.77± 0.90
Control group	63.47± 2.11	10.67± 2.06	25.85± 0.21

Note : *: P<0.05 compared with control group

结合并磷酸化和调节 SPAG5 与纺锤体以及中心粒的定位^[8] ,而 SPAG5 本身可结合并调节有丝分裂过程的一个重要的激酶 Aurora-A 在纺锤体上的定位^[10] ,在有丝分裂过程中 ,CLASP1 , SPAG5(astrin)和 Kif2b 在着丝粒上形成一个分子开关 ,共同调节着丝粒 - 微管动力学 ,促进有丝分裂的进程和有丝分裂的忠实性^[14] ,这些结果表明 SPAG5 通过与其他蛋白的相互作用 ,在有丝分裂进程的动态调节网络中起着重要作用。相应地 , SPAG5 的敲低将导致多极异常纺锤体的形成 ,有丝分裂停滞 ,细胞生长阻滞并最终导致细胞凋亡^[10,11,15]。根据 ORP8-SPAG5 的相互作用 ,我们推测 ORP8 作为一个氧化固醇结合蛋白 ,有可能整合脂质代谢调节与有丝分裂的调节 ,影响有丝分裂的进程以及进一步的细胞凋亡。ORP8 对细胞周期影响的初步观察显示 ORP8 可能通过其与 SPAG5 的相互作用 ,参与到有丝分裂过程的动态调节网络中。

除此之外 ,在有丝分裂间期 ,SPAG5 定位于内质网上^[16] ,这与 ORP8 的内质网定位一致 ,进一步提示了 ORP8-SPAG5 相互作用在细胞内发生的可能性 ,以及 SPAG5 与 ORP8 在有丝分裂间期形成复合体 ,影响细胞的各种生命活动的可能性。然而 ,对 SPAG5 在有丝分裂间期的功能仍未见报道 ,ORP8 对 ABCA1 转录翻译后胆固醇流出的调节^[7]是否涉及 SPAG5 在有丝分裂间期的作用还有待研究 ,ORP8-SPAG5 的相互作用不仅

3 讨论

本研究通过酵母双杂交筛选出 SPAG5 为 ORP8 相互作用的蛋白 ,进一步经 GST Pull-down 以及 Co-IP 实验确证了 ORP8-SPAG5 的相互作用 ,并根据 SPAG5 的已知功能 ,推测并通过实验初步证实了 ORP8 对细胞周期的影响。

ORP8 是 ORPs 家族的一个成员 ,通过其氧化固醇的结合域在体外结合二十五羟基胆固醇 ,通过其 C - 末端的跨膜片段 ,定位到内质网上 ,在巨噬细胞及肝脏中高表达 ,在单核巨噬细胞系中 ,ORP8 强烈下调 ABCA1 的转录表达及胆固醇的流出 ,参与脂质代谢调控^[7]。然而 ,目前对 ORP8 功能以及其发挥功能的了解仍是非常片面。本研究报道 ORP8-SPAG5 的相互作用 ,由此推导并初步证实了 ORP8 对细胞周期的影响 ,为探索 ORP8 的新功能及其机制提供了一个有用的线索。

SPAG5(也称作 astrin ,hMAP126)作为纺锤体结合非动力蛋白质被鉴定 ,在有丝分裂期 ,SPAG5 定位于纺锤体上 ,并在有丝分裂中期定位于着丝粒上^[12,13]。随后的研究发现 hNinein 与 SPAG5 相结合并调节 S 期和 G2 期的中心体定位^[9] ,糖原合成酶激酶 3β(Glycogen Synthase Kinase 3β ,GSK3β)与 SPAG5 相

仅提示了 ORP8 的功能及其机制 ,也为 SPAG5 功能的研究打开了一个新的方向。

SPAG5 在睾丸中高表达 ,而在卵巢未检测到^[13] ,显示 SPAG5 可能具有性别特异性的作用。在 ORP8 基因敲除鼠中 ,已观察到 ORP8 对血脂的影响有强的性别依赖性 (结果未发表) ,这种依赖性的产生是否与 ORP8-SPAG5 的相互作用以及 SPAG5 在不同性器官中的特异性表达有关仍有待进一步的研究。本研究筛选确证了 ORP8-SPAG5 的相互作用 ,为更好的研究 ORP8 的生物学功能及其机制提供了有用的线索 ,为 ORP8 的功能研究打开了新的视野 ,并可能对 SPAG5 蛋白的功能研究也有了新的提示作用。

参 考 文 献 (References)

[1] Shibata N, Glass CK. Macrophages, oxysterols and atherosclerosis [J]. Circ, 2010, 74:2045-2051

[2] Lehto M, Laitinen S, Chinetti G, et al. The OSBP-related protein family in humans [J]. Lipid Res, 2001, 42:1203-1213

[3] Im YJ, Raychaudhuri S, Prinz WA, et al. Structural mechanism for sterol sensing and transport by OSBP-related proteins [J]. Nature, 2005, 437:154-158

[4] Wang PY, Weng J, Anderson RG, et al. OSBP is a cholesterol-regulated scaffolding protein in control of ERK 1/2 activation [J]. Science, 2005, 307:1472-1476

(下转第 2623 页)

universitatis medicinalis nanjing, 2008,28(8),973-976

- [5] 非酒精性脂肪性肝病诊疗指南 [J]. 临床肝胆病学, 2010, 26(2): 120-124
Guidelines for diagnosis and treatment of nonalcoholic fatty liver diseases[J]. Journal of Clinical Hepatology, 2010, 26(2): 120-124
- [6] Bedogni G, Miglioli L, Masutti F, et al. Prevalence of and risk factors for nonalcoholic fatty liver disease: the Dionysos nutrition and liver study[J]. Hepatology, 2005, 42: 44-52
- [7] Farrell GC, Larter CZ. Nonalcoholic fatty liver disease: from steatosis to cirrhosis[J]. Hepatology, 2006, 43: S99-112
- [8] Fan JG, Zhu J, Li XJ, et al. Prevalence of and risk factors for fatty liver in a general population of Shanghai, China [J]. J Hepatol, 2005, 43: 508-514
- [9] 范建高, 曾民德. 非酒精性脂肪性肝病的分类及其诊断策略[J]. 中华肝脏病杂志, 2003, 11: 127-128
Fan Jian-gao, Zeng Ming-de. Classification and diagnostic strategies of nonalcoholic fatty liver diseases[J]. Chinese Journal of Hepatology, 2003, 11: 127-128

- [10] Day CP, James OF. Hepatic steatosis: Innocent bystander or guilty party? [J]. Hepatology, 1998, 27: 1463-1466
- [11] 李大伟, 张玲, 夏作理. 建立高脂血症模型的动物选择与常用造模方法分析及改进[J]. 中国临床康复, 2006, 10(48): 145-147
Li Da-wei, Zhang Ling, Xia Zuo-li. Choice of hyperlipidemia model animals as well as analysis and improvement of common method of establishing models [J]. Chinese Journal of Clinical Rehabilitation, 2006, 10(48): 145-147
- [12] 张智, 闪增郁, 向丽华, 等. 大鼠实验性高脂血症两种造模方法的比较[J]. 中国中医基础医学杂志, 2004, 10(2): 33-34
Zhang Zhi, Shan Zeng-yu, Xiang Li-hua, et al. Comparison of the Two Models on Experimental Hyperlipidemia of Rats [J]. Chinese Journal of Basic Medicine In Traditional Chinese Medicine, 2004, 10(2): 33-34
- [13] Ren D, Collingwood TN, Rebar EJ, et al. PPAR γ knockdown by engineered transcription factors :exogenous PPAR γ 2 but not PPAR γ 1 reactivates adipogenesis[J]. Genes Dev, 2002, 16: 27-32

(上接第 2604 页)

- [5] Du X, Kumar J, Ferguson C, et al. A role for oxysterol-binding protein-related protein 5 in endosomal cholesterol trafficking [J]. Cell Biol, 2011, 192: 121-135
- [6] Yan D, Olkkonen VM. Characteristics of oxysterol binding proteins [J]. Int Rev Cytol, 2008, 265: 253-285
- [7] Yan D, Mayranpaa MI, Wong J, et al. OSBP-related protein 8 (ORP8) suppresses ABCA1 expression and cholesterol efflux from macrophages [J]. J Biol Chem, 2008, 283: 332-340
- [8] Cheng TS, Hsiao YL, Lin CC, et al. Glycogen synthase kinase 3 β interacts with and phosphorylates the spindle-associated protein astrin [J]. J Biol Chem, 2008, 283: 2454-2464
- [9] Cheng TS, Hsiao YL, Lin CC, et al. hNinein is required for targeting spindle-associated protein Astrin to the centrosome during the S and G2 phases [J]. Exp Cell Res, 2007, 313: 1710-1721
- [10] Du J, Jablonski S, Yen TJ, Hannon GJ. Astrin regulates Aurora-A localization [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2008, 370: 213-219
- [11] Gruber J, Harborth J, Schnabel J, et al. The mitotic-spindle-associated protein astrin is essential for progression through mitosis [J]. J Cell

Sci, 2002, 115: 4053-4059

- [12] Mack GJ, Compton DA. Analysis of mitotic microtubule-associated proteins using mass spectrometry identifies astrin, a spindle-associated protein [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2001, 98: 14434-14439
- [13] Chang MS, Huang CJ, Chen ML, et al. Cloning and characterization of hMAP126, a new member of mitotic spindle-associated proteins [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2001, 287: 116-121
- [14] Manning AL, Bakhoum SF, Maffini S, et al. CLASP1, astrin and Kif2b form a molecular switch that regulates kinetochore-microtubule dynamics to promote mitotic progression and fidelity [J]. Embo J, 29: 3531-3543
- [15] Suzuki H, Yagi M, Suzuki K. Duplicated insertion mutation in the microtubule-associated protein Spag5 (astrin/MAP126) and defective proliferation of immature Sertoli cells in rat hypogonadic (hgn/hgn) testes [J]. Reproduction, 2006, 132: 79-93
- [16] Fitzgerald CJ, Oko RJ, van der Hoorn FA. Rat Spag5 associates in somatic cells with endoplasmic reticulum and microtubules but in spermatozoa with outer dense fibers [J]. Mol Reprod Dev, 2006, 73: 92-100