

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2017.26.001

• 基础研究 •

FKBP38 肝脏特异敲除小鼠模型的构建*

王 帅¹ 赖婕梅² 林 艳¹ 李晓曦¹ 赵子建^{1Δ}

(1 南京医科大学代谢疾病研究中心 江苏 南京 210029; 2 赣南医学院第一附属医院 江西 赣州 341000)

摘要 目的:构建 FKBP38(FK506 Binding Protein 38)基因肝脏特异敲除小鼠。**方法:**利用胚胎注射法构建在 FKBP38 上携带 loxP 位点的转基因小鼠。在 FKBP38 基因位置携带 loxP 位点的小鼠的基础上,以肝脏实质细胞特异性表达的 Alb-Cre 介导 FKBP38 条件性敲除,以获得 FKBP38 基因肝脏特异敲除小鼠模型 Alb-Cre:FKBP38^{fl/fl}。同时对 FKBP38 特异性敲除鼠进行鉴定。**结果:**① FKBP38 肝脏特异敲除小鼠 FKBP38^{-/-}肝脏中 FKBP38 基因的 mRNA 水平相对于同年龄同窝野生型小鼠具有统计学差异(P<0.001)。② FKBP38 肝脏特异敲除小鼠 FKBP38^{-/-}肝脏中 FKBP38 基因的蛋白表达水平相对于同年龄同窝野生型小鼠具有统计学差异(P<0.001)。③ FKBP38 肝脏特异敲除小鼠 FKBP38^{-/-}肝脏中,转录和翻译相关蛋白水平未见显著差异,p70 S6K 的磷酸化水平轻微上调,4EBP-1 的磷酸化水平有轻微下调。④ FKBP38 肝脏特异敲除小鼠 FKBP38^{-/-}肝脏中,凋亡相关蛋白 Bcl-2 未见差异化表达。**结论:**FKBP38 肝脏特异敲除小鼠 FKBP38^{-/-}肝脏中,FKBP38 基因的 mRNA 和蛋白基本不表达,提示成功构建 FKBP38 基因肝脏特异敲除小鼠。

关键词:FKBP38; 肿瘤; 条件性敲除; Cre/loxP 重组酶系统

中图分类号:Q95-3; Q78; Q593.1 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2017)26-5001-06

Construction of a Mouse Model of Hepatocyte Cell-specific Disruption of the FKBP38 Gene*

WANG Shuai¹, LAI Yi-mei², LIN Yan¹, LI Xiao-xi¹, ZHAO Zi-jian^{1Δ}

(1 Center of Metabolic Disease Research, School of Basic Medical Sciences, Nanjing Medical University, Nanjing, Jiangsu, 210029, China; 2 Department of Pathology, the First Affiliated Hospital of Gannan Medical University, Ganzhou, Jiangxi, 341000, China)

ABSTRACT Objective: To build the model of the gene FKBP38 (FK506 binding protein 38) conditional knock out in liver. **Methods:** Transgenic mouse whose FKBP38 gene was flanked with loxP was constructed by embryo microinjection. The FKBP38 gene was deleted by breeding mice harboring two loxP sites in FKBP38 (FKBP38^{fl/fl}) with the mice bearing the expression of Cre recombinase mice driven by an album promoter. Afterward, the genotype of FKBP38 conditional knockout mice was analyzed. **Results:** ① Relative hepatic FKBP38 mRNA levels showed significant difference between FKBP38 conditional knockout mice (FKBP38^{-/-}) and wild type(P<0.001). ② Relative hepatic FKBP38 protein expression levels of FKBP38 conditional knockout mice (FKBP38^{-/-}) were significantly different with wild type(P<0.001). ③ Relative phosphorylation of hepatic p70 S6K and 4E-BP-1 protein of FKBP38 conditional knockout mice (FKBP38^{-/-}) showed no significant difference, with slight decrease in phosphorylation of 4E-BP-1, compared with wild type. ④ No significant difference in expression of hepatic Bcl-2 between FKBP38^{-/-} and wild type. **Conclusions:** The mouse model of the gene FKBP38 (FK506 binding protein 38) conditional knock out in liver is successfully built.

Key words: FKBP38; Tumor; Conditional knock out; Cre/loxP recombinase system

Chinese Library Classification(CLC): Q95-3; Q78; Q593.1 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2017)26-5001-06

前言

FK506-binding protein (FKBP, FK506 结合蛋白)蛋白存在于很多真核细胞中,并且高度保守。FKBP 中有众多家族成员,是一群多功能蛋白。FKBP38 是 FKBP 蛋白家族中的一个非经

典的 FKBP 蛋白,其包含一个跨膜结构域,主要定位于线粒体和内质网^[1,2]。它能招募抗凋亡蛋白 Bcl-2 和 Bcl-X_L 至线粒体从而抑制凋亡^[3]。也影响着 BCL-2 的稳定性^[4]。它是 mTOR (mammalian target of rapamycin)的内源性抑制剂^[5],能够结合到 mTOR 上并抑制其活性,从而抑制通路下游的调控因子,对细

* 基金项目:国家重点基础研究发展规划(973 计划)(2013CB945202);国家自然科学基金项目(81372798);

江苏省自然科学基金项目(BK20130059)

作者简介:王帅(1990-),主要研究方向:代谢疾病,电话:15250961512, E-mail: lian_over@outlook.com

Δ 通讯作者:赵子建,博士生导师,教授,主要研究方向:代谢疾病、肿瘤, E-mail: azzhao@njmu.edu.cn

(收稿日期:2017-03-30 接受日期:2017-04-20)

胞的生存、增殖等造成影响。

据不同的学者的研究结果来看,FKBP38 在不同肿瘤细胞中的表达差异很大。在半分化的 Schwannoma 细胞系中能够检测到 FKBP38 的表达,而在低分化的 Schwannoma 细胞系中则检测不到^[6]。同样地,FKBP38 在高转移性的黑色素瘤细胞中的表达低于低转移性黑色素瘤细胞^[7]。在不同癌症组织中,FKBP38 蛋白表达的下调,更表明 FKBP38 蛋白在可能在抑制癌细胞增殖或促进癌细胞凋亡方面有重要的作用^[8]。

简单的基因缺失常常无法揭示其不同组织和器官中的不同的功能。条件性的基因突变则使我们可以对基因在特定细胞中的功能进行研究。本研究通过 Cre/loxP 重组酶系统构建了肝脏特异敲除 FKBP38 基因的小鼠模型^[9],为下一步研究 FKBP38 在肝脏中对肿瘤发生发展的作用及其与凋亡的相关作用奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 动物 Alb-Cre 小鼠和野生型小鼠购自南京大学模式动物研究所;FKBP38^{fl/fl} 条件性敲除小鼠由本课题组构建,均为 C57BL/6J 品系。所有实验小鼠均在稳定的环境中饲养,温度 20-22℃,湿度 50%-70%,光照周期为 12 h/12 h;食物和水不限量供应。

1.1.2 试剂 酚:氯仿:异戊醇(25:24:1)购自北京索莱宝公司,

蛋白酶 K 购自美国 Sigma 公司,2X Taq Master Mix、DNA marker 购自 Vazyme 公司,引物由南京金斯瑞生物科技有限公司合成。FKBP38 抗体购自 R&D 公司,Bcl-2 抗体购自 Abcam 公司,P-4EBP-1 (T37/46) 和 4EBP-1,P-p70 S6K (T389) 和 p70 S6K 抗体均购自 Cell Signaling Technology 公司,SYBR Green mix 购自 Roche 公司。

1.2 方法

1.2.1 FKBP38 基因肝脏特异敲除小鼠构建 利用胚胎显微注射法分别在小鼠 FKBP38 基因的第 2 号和第 3 号,第 6 号和第 7 号外显子之间分别插入一个 loxP 位点,得到 FKBP38^{wt} 小鼠。利用 Cre/loxP 系统将成年的 F0 代 FKBP38 小鼠与携带有肝脏特异表达 Cre 酶的 Alb-Cre 小鼠交配,得到 F1 代 Alb-Cre/+FKBP38^{wt},由 F1 代 Alb-Cre/+FKBP38^{wt} 和 F1 代 Alb-Cre/+FKBP38^{wt} 交配,得到 Alb-Cre/+FKBP38^{fl/fl} 小鼠,同时以同龄同窝野生型小鼠作为对照鼠。

1.2.2 小鼠基因型鉴定 取小鼠鼠尾,加入现配的蛋白酶 K(5 mg/mL)和鼠尾裂解液以 1:50 比例混合的 500 μL 混合液中,55℃水浴过夜后提 DNA。取 1 μL DNA 进行 PCR 扩增,PCR 产物进行 1%琼脂糖凝胶电泳,紫外观察,根据对应片段长度进行基因型鉴定。Alb-Cre 基因鉴定使用 oIMR1084,oIMR1085,oIMR7338,oIMR7339 四种引物反应,FKBP38 的 loxP 位点鉴定使用 F1,R1,F2,R2 四种引物。鉴定引物见表 1,由南京金斯瑞生物科技有限公司合成。

表 1 基因鉴定引物
Table 1 Primers for genotype identification

Gene	Primer		Sequence(5'→3')	Length(bp)
Alb-Cre	oIMR1084	F	GCGGTCTGGCAGTAAAAA CTATC	~150
	oIMR1085	R	GTGAAACAGCATTGCTGTCACTT	
	oIMR7338	F	CTAGGCCACAGAATTGAAAGATCT	
	oIMR7339	R	GTAGGTGGAAATTCTAGCATCATCC	324
FKBP38	F1	F	TCATGCAGGCAGAGTGCACATAG	MT:272 WT:217
	R2	R	TGGAGACAGGCATTTTCAGATCACA	
	F2	F	ACTGAGGCCACACAATCTAGGT	MT:301 WT:173
	R2	R	TGGAGACAGGCATTTTCAGATCACA	

1.2.3 小鼠肝脏 FKBP38 基因 mRNA 水平检测 取成年小鼠新鲜肝脏,加入 500 μL Trizol 中,于多样品组织匀浆仪 Tissue-luser-48 中匀浆,经提取得到总 RNA,使用 Nanodrop 测得 RNA 浓度。再利用 Vazyme 公司的逆转录试剂盒逆转录得到 cDNA。以提取的实验组与对照组小鼠 cDNA 为模板,EX-

ON5-7-F 和 EXON5-7-R 为目的基因 FKBP38 引物,Actin-F 和 Actin-R 为内参 Actin 引物,Roche 公司的 Power SYBR Green PCR Master Mix 为体系进行 RT-qPCR。RT-qPCR 引物见表 2,由南京金斯瑞生物技术有限公司合成。

表 2 RT-qPCR 引物
Table 2 Primers for RT-qPCR

Genes	Primers		Sequence(5'→3')
FKBP38	EXON5-7-F	F	CCTCCAACACCAAAGTGGAC
	EXON5-7-R	R	CTTTGAGAGCTCTGCGTGGA
ACTIN	Actin-F	F	AAATCGTGCGTGACATCAAAGA
	Actin-R	R	GCCATCTCCTGCTCGAAGTC

1.2.4 小鼠肝脏蛋白表达水平检测 取成年小鼠肝脏,加入到 400 μ L 添加有 PMSF 的 RIPA 裂解液中,于多样品组织匀浆仪 TissueLuser-48 中匀浆,经提取得到的蛋白使用 BCA 法测浓度。Western Blot 检测实验组与对照组小鼠肝脏中相关蛋白的表达水平。

1.2.5 小鼠体重测量 四周龄小鼠开始称重,每周同一天同一时间点测一次。分为三组,分别为同窝野生型,FKBP38^{wt/Δ}, FKBP38^{-/-}。以同窝野生型小鼠作为对照。

1.3 统计学方法

统计部分结果采用 GraphPad Prism 5 统计软件进行分析。

mRNA 水平和体重的统计数据的结果以平均数 $\pm$ 标准误差($x \pm SEM$)表示,实验组和对照组之间采用单因素方差分析(one-way ANOVA),Turkey 检验比较, $P < 0.001$ 认为差异有统计学意义。ImageJ 进行 Western Blot 条带灰度分析。Western Blot 相对灰度的结果采用 Unpaired t-test 检验比较实验组和对照组, $P < 0.001$ 认为有统计学意义。

2 结果

2.1 基因组,转录和蛋白水平验证 FKBP38 基因已经在肝脏中被敲除

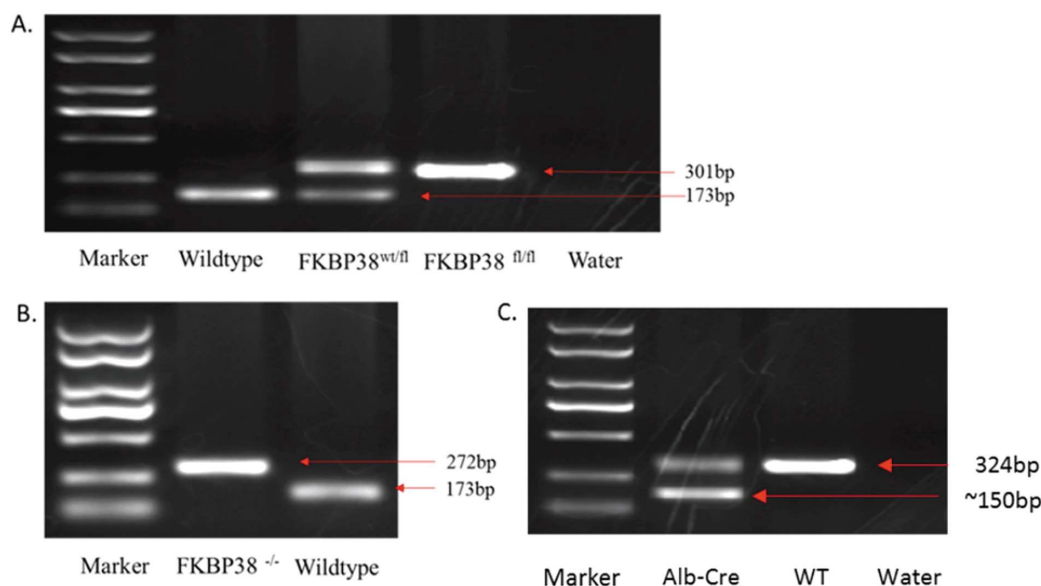


图 1 FKBP38 肝脏特异敲除小鼠基因型鉴定结果

Fig. 1 Genotype identification of FKBP38 conditional knockout mice in liver

Note: A: mouse tail PCR identification of loxP-flanked FKBP38; B: mouse liver PCR identification; C: mouse tail PCR identification of Alb-Cre

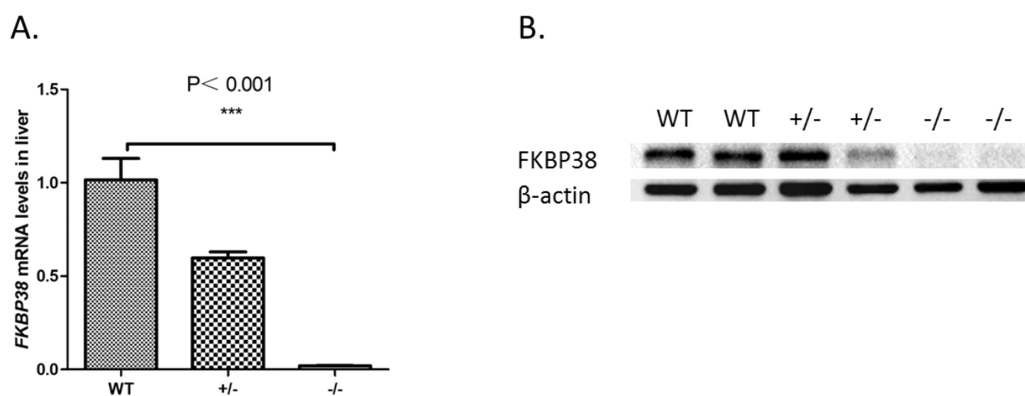


图 2 FKBP38 肝脏特异敲除小鼠肝脏中 FKBP38 基因转录和蛋白水平

Fig.2 Relative levels of mRNA and protein of FKBP38 conditional knockout mice in liver

Note: A: Relative mRNA levels of mice with FKBP38^{-/-} and FKBP38^{+/-}; B: Relative protein expression levels of mice with FKBP38^{-/-} and FKBP38^{+/-}. Compared with the genotype of C57BL/6J, $x \pm SEM$, $n=4$, *** $P < 0.001$.

首先用 PCR 鉴定鼠尾出 F0 代 FKBP38^{wt/Δ} 小鼠,如图 1A 所示。然后 F0 代 FKBP38^{wt/Δ} 与携带有肝脏特异表达 Cre 酶的 Alb-Cre 小鼠交配,PCR 检测 loxP 位点,301 bp 为目的条带,173 bp 为野生型条带;Alb-Cre,150 bp 为阳性条带,分别如图 1A, 1C 所示,得到 F1 代 Alb-Cre/+FKBP38^{wt/Δ}。由 F1 代

Alb-Cre/+FKBP38^{wt/Δ} 和 F1 代 Alb-Cre/+FKBP38^{wt/Δ} 交配,PCR 检测鼠尾中的 Alb-Cre 和 loxP 位点,只有 301 bp 即表示两条等位基因上皆携带了 loxP 位点,如图 1A, 1C 所示,然后再检测肝脏中由 Cre/loxP 重组酶系统重组得到的 loxP 位点,目的条带约为 272bp,如图 1B 所示,得到 Alb-Cre/+FKBP38^{wt/Δ} 小鼠,同

时以同龄同窝野生型小鼠作为对照鼠。

为了进一步验证 FKBP38 基因在肝脏中特异敲除,我们检测了小鼠肝脏中目的基因的 mRNA 水平,相较于野生型小鼠, Alb-Cre/+FKBP38^{fl/fl} 小鼠中的目的基因 mRNA 基本不表达。如图 2A 所示。最后,我们提取了小鼠肝脏中的总蛋白,以 β -actin 做内参,可以看到相较于野生型小鼠, Alb-Cre/+FKBP38^{fl/fl} 小鼠中的目的基因蛋白基本不表达,如图

2B 所示。以上结果表明,基因型为 FKBP38^{-/-} 的肝脏特异敲除小鼠的 FKBP38 基因的 mRNA 水平和蛋白表达水相较于同龄同窝野生型小鼠差异明显。

FKBP38 基因肝脏特异敲除小鼠的肝脏所提取的 DNA, RNA 和蛋白分析所得结果均表明 FKBP38 基因已经在小鼠肝脏中被特异敲除。

2.2 FKBP38 基因缺失对肝脏中 mTOR 通路的影响

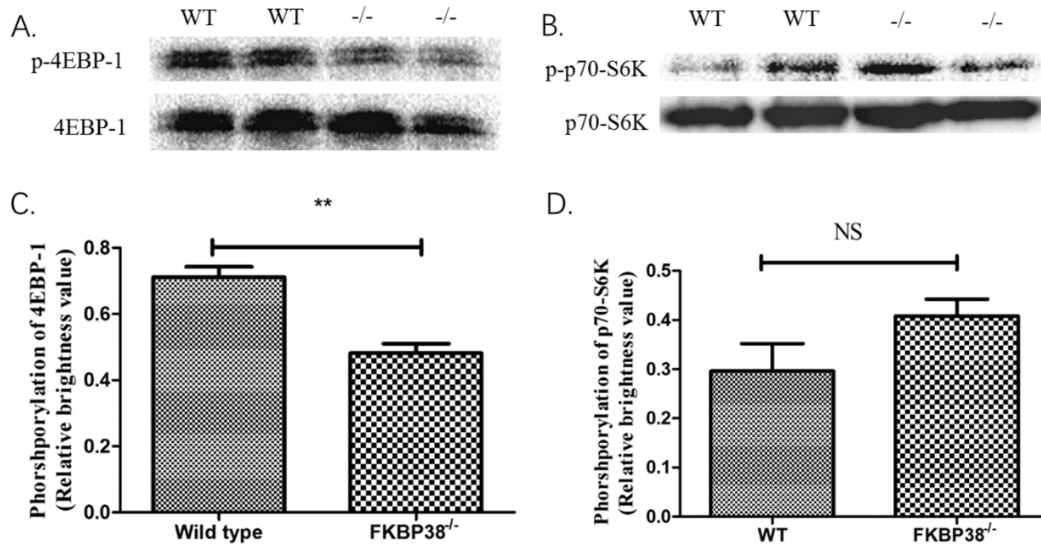


图 3 小鼠肝脏中 p70 S6K 和 4E-BP-1 的磷酸化水平检测

Fig. 3 Phosphorylation of p70 S6K and 4E-BP-1 in mice liver

Note: A: phosphorylation of p70 S6K at T389 in mice liver; B: phosphorylation of 4E-BP-1 at T37/46 in mice liver; C: the bar chart of 4EBP-1 and phosphorylation of 4EBP-1, $x \pm$ SEM, n=4, **P<0.05; D: the bar chart of p70 S6K and phosphorylation of p70 S6K, $x \pm$ SEM, n=4, ns.

FKBP38 能够与 mTOR 结合,并作为其活性的抑制剂。p70 S6K^[10-12]和 4EBP-1^[12-14]是 mTOR 复合物 1 的直接底物,通过验证 p70 S6K 和 4EBP-1 的磷酸化水平,可以间接地表明 mTOR 的激活水平。FKBP38 肝脏特异敲除小鼠的肝脏中 mTOR 下游基因 p70 S6K 磷酸化相对于野生型小鼠有差异,但并不显著(见图 3A)。而在 FKBP38 肝脏特异敲除小鼠的肝脏中 mTOR 下游基因 4E-BP-1 的磷酸化水平野生型小鼠磷酸化水平较低,差异也不显著(见图 3B)。FKBP38 是 mTOR 的内源性抑制剂^[2],但在体内的磷酸化水平却提示我们肝脏中可能会存在一个反馈系统,导致 4E-BP-1 磷酸化水平反而降低。这就需要我们进一步深入研究其与细胞的转录和翻译相关的通路的相互关系。

2.3 FKBP38 基因缺失对肝脏中 Bcl-2 蛋白水平的影响

FKBP38 影响着 Bcl-2 的稳定性,能够保护其不被降解。但在 FKBP38 基因肝脏特异敲除的小鼠肝脏中 Bcl-2 的水平相较于对照组无明显差异(见图 4)。

2.4 FKBP38 基因缺失对小鼠体重的影响

从四周龄开始,每周同一时间称量小鼠体重,统计结果显示,24 周龄小鼠体重仍未见明显差异(如图 5 所示)。

3 讨论

在全球范围内,肝癌在男性癌症发病率中处于第五,女性

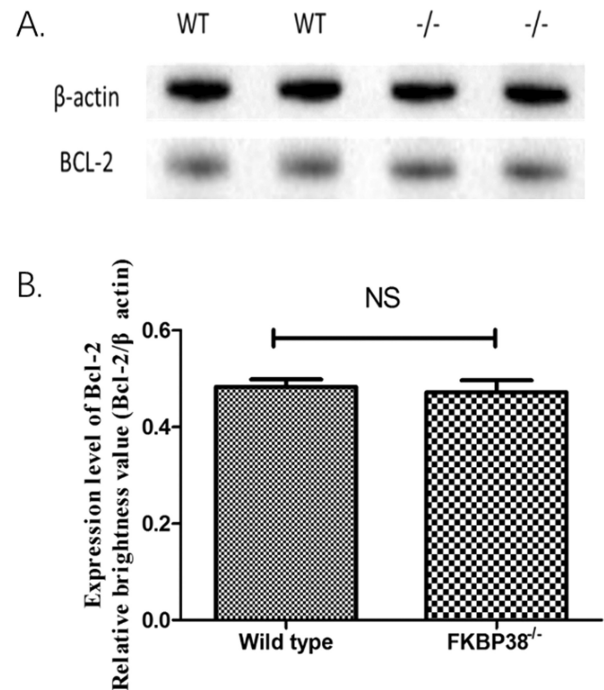


图 4 小鼠肝脏中 BCL-2 表达水平

Fig. 4 BCL-2 expression levels in mouse liver

Note: A: expression levels of Bcl-2 in mice liver with wild type (WT) and FKBP38^{-/-} (-/-); B: the bar chart of relative expression levels of Bcl-2, $x \pm$ SEM, n=4, ns.

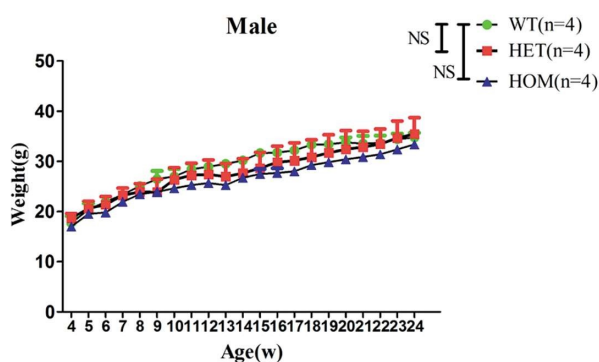


图 5 小鼠体重

Fig.5 Body weight of the mice

Note: WT=Wild type, HET=heterozygous (FKBP38^{+/+}),

HOM=homozygous (FKBP38^{-/-}), $\bar{x} \pm \text{SEM}$, n=4, ns.

的是第九,而其致死率则为全球第二,其中发展中国家的发病率要比发达国家更高^[15]。病毒性肝炎是肝细胞癌的重要诱因之一,其中乙型肝炎病毒或者丙型肝炎病毒的慢性感染所引发的癌症则报道更多^[16]。其他还有一些重要的因素也会导致肝癌的发生,如过量饮酒,肥胖,非酒精性脂肪肝,代谢紊乱和II型糖尿病^[17]。Otta Heinrich Warburg 在 100 多年前就提出了细胞代谢和肿瘤形成之间存在的联系,但它们之间的关系直到最近的几十年才渐渐被揭开^[18]。mTOR 通路则是其中关键的代谢信号通路之一。在最新的一篇研究中发现在使用 mTOR 抑制剂进行免疫抑制治疗后,肝脏移植后 Donor-specific antibodies (DSAs)的出现频率显著低于使用其他食物疗法^[19]。另外也有研究显示在移植瘤模型中,欧前胡素能通过抑制 mTOR 通路靶向抑制 HIF-1 α ,从而对肿瘤血管增生起到明显抑制作用^[20]。FKBP38 是 mTOR 的内源性抑制剂^[9],它能够结合到 mTOR 上并抑制其活性,从而抑制通路下游的调控因子,对细胞的生存、增值等造成影响。在不同癌症组织中,FKBP38 蛋白表达也出现了不同程度的下调,有的组织中甚至出现了阴性结果,这些都更表明 FKBP38 蛋白在可能在抑制癌细胞增殖或促进癌细胞凋亡方面有重要的作用^[8]。另外,FKBP38 主要定位在胞浆内的线粒体膜上,它能够募集 BCL-2 定位到线粒体上^[1],同时并保护其不被降解^[4],从而行使其抗凋亡作用。为了研究 FKBP38 与肿瘤生成之间是存在着相关性还是存在着因果关系,我们构建了 FKBP38 组织特异敲除小鼠模型。

有研究者构建了 FKBP38 全身敲除小鼠模型,但小鼠于胚胎期或者出生不久即死亡,表现为神经系统显著的先天畸形 - 无节制的细胞凋亡从而导致神经上皮高度紊乱^[21]。Cre/loxP 重组酶系统在新型基因打靶中有着应用广泛,其既可以在细胞水平上用 Cre 重组酶表达质粒转染靶细胞,识别 LoxP 位点将目的基因切除,同时又可以在个体水平上将重组杂合子小鼠与 Cre 转基因小鼠杂交,筛选子代小鼠就可得到删除目的基因的条件性敲除小鼠。

因此,为了研究其在肝脏中的功能,本研究利用 Cre/loxP 重组酶系统成功构建了 FKBP38 条件性敲除小鼠模型。由于性激素对肝癌的诱导成功率有着重要的影响^[22],雄性相较于雌性的诱癌率高,故本研究全部使用雄性 C57BL/6J 背景的小鼠^[23]。

在本研究中,FKBP38 肝脏特异敲除小鼠 mTOR 下游转录、翻译相关蛋白 p70 S6K 可见轻微磷酸化上调,这就间接表明 mTOR 磷酸化上升,这与之前研究者得到的结果相一致;4E-BP-1 的磷酸化则轻微降低,与 p70 S6K 则相反,却间接表明 mTOR 磷酸化下调。由于 p70 S6K 和 4EBP-1 是 mTOR 的直接底物,因此按照理论其磷酸化水平应该保持一致,这在最新的细胞水平的研究结果中也表明了这一理论,即在山羊胚胎成纤维细胞中使用 siRNA 沉默 FKBP38 基因来诱导激活 mTOR 信号通路导致其下游的 p70 S6K 和 4EBP-1 磷酸化增加^[24]。这一矛盾结果提示我们下一步要检测 mTOR 的磷酸化。p70 S6K 和 4EBP-1 的磷酸化水平不一致同时还提示我们其中可能存在反馈机制或者其他调节机制。如果 mTOR 的磷酸化是上调的,则说明确实可能存在其他反馈机制或者其他调节因子对 4EBP-1 的磷酸化以及 eIF-4 的磷酸化进行调节。这些结果提示我们,可能在正常代谢的情况下,FKBP38 作为 mTOR 内源性抑制剂,确实能够影响细胞生长和增殖,但是作用却不显著, Yoon MS 等人发现磷脂酸会替代 FKBP38 激活 mTOR^[25],Rheb 也是 FKBP38 的拮抗剂^[9],同时,Blaskovich MA 等发现溶血磷脂酸酰基转移酶 β 会通过影响 FKBP38 与 mTOR 的结合从而调节 mTOR 信号通路,研究表明当溶血磷脂酸酰基转移酶 β 被沉默后,FKBP38 与 mTOR 的结合显著上升^[26];当然,也有可能是观察时间不够。另外,Bcl-2 蛋白的表达水平也未受到影响。这一结果都与之前学者的研究不符合,理论上在缺失了 FKBP38 蛋白之后,Bcl-2 也就失去了 FKBP38 蛋白的保护,则其蛋白水平应该下降,而我们得到了在组织特异敲除 FKBP38 后,相应组织中的 Bcl-2 的水平却没有发生明显的变化,这就提示我们在体内复杂的微环境中,FKBP38 在肝脏中相对于在抗凋亡作用方面可能只是扮演了一个辅助因子的作用,或者其关键性的调控因素被其他各种代谢通路以及调控因子影响了。因此,为了探讨 FKBP38 在凋亡相关通路中的作用及其具体的机制,我们下一步将研究在缺失 FKBP38 的条件下,在肝脏细胞中的 Bcl-2 以及凋亡相关蛋白在细胞内的定位,探讨 FKBP38 在 Bcl-2 以及相关蛋白的定位中是否发挥关键作用;探讨线粒体的功能是否会因为 FKBP38 的缺失而受到影响;在观察足够时间的情况下进行病理分析,观察肝脏组织中是否存在典型增生或者是细胞凋亡。而在诸多研究中,不同肿瘤细胞中的 FKBP38 则明显出现了差异化表达。这就提示我们下一步应该考虑在体内的应激状态以及肿瘤模型下,深入研究 FKBP38 与其它相关通路以及调节因子的相互作用。FKBP38 肝脏特异敲除小鼠与野生型小鼠的体重没有明显差异。我们下一步计划构建在其他组织中特异性敲除 FKBP38 的小鼠的模型,以研究 FKBP38 在不同组织和不同细胞中的定位以及功能。

综上所述,本研究成功构建了 FKBP38 肝脏特异敲除小鼠模型,并对 FKBP38 肝脏特异敲除小鼠模型与野生型小鼠在 mTOR 通路和细胞凋亡两个方面的比较结果进行了分析和探讨,发现 FKBP38 缺失后 mTOR 下游蛋白的磷酸化,p70 S6K 轻微上调,4EBP-1 则下调。Bcl-2 蛋白则无明显变化。以上结果不能完全说明 FKBP38 对于 mTOR 的抑制作用以及对 Bcl-2

的保护作用,颇具争议。这一结论提示我们 FKBP38 在调节细胞内的 mTOR 通路和细胞凋亡方面的作用还需要更深入的研究。

参考文献(References)

- [1] Shirane M, Nakayama K.I. Inherent calcineurin inhibitor FKBP38 targets Bcl-2 to mitochondria and inhibits apoptosis [J]. *Nat Cell Biol*, 2003, 5(1): 28-37
- [2] Wang HQ, Nakaya Y, Du Z, et al. Interaction of presenilins with FKBP38 promotes apoptosis by reducing mitochondrial Bcl-2 [J]. *HumMol, Genet*, 2005, 14: 1889-1902
- [3] Wang J, Tong W, Zhang X, et al. Hepatitis C virus non-structural protein NS5A interacts with FKBP38 and inhibits apoptosis in Huh7 hepatoma cells[J]. *FEBS Lett*, 2006, 580: 4392-4400
- [4] Bo-Hwa Choi, Lin Feng, Ho Sup Yoon. FKBP38 Protects Bcl-2 from Caspase-dependent Degradation [J]. *J Biol Chem*, 2009,285 (13): 9770-9779
- [5] Xiaochun Bai, Dongzhu Ma, Anling Liu. Rheb activates mTOR by antagonizing its endogenous inhibitor, FKBP38 [J]. *Science*, 2007, 318: 997-980
- [6] Pedersen KM, Finsen B, Celis JE, et al. muFKBP38: a novel murine immunophilin homolog differentially expressed in Schwannoma cells and central nervous system neurons in vivo[J]. *Electrophoresis*, 1999, 20: 249-255
- [7] Kashani-Sabet M, Liu Y, Fong S, et al. Identification of gene function and functional pathways by systemic plasmid-based ribozyme targeting in adult mice [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99: 3878-3883
- [8] 赖斌梅, 巩思嘉, 师惠, 等. 卵巢上皮性肿瘤中 FKBP38 蛋白的表达研究[J]. *现代生物医学进展*, 2016, 16(18): 3435-3438
Lai Yi-mei, Gong Si-jia, Shi Hui, et al. Expressions of FKBP38 in Epithelial Ovarian Cancer[J]. *Progress in Modern Biomedicine*, 2016, 16(18): 3435-3438
- [9] Pluck A. Conditional mutagenesis in mice: the Cre/loxP recombination system [J]. *International journal of experimental pathology*, 1996, 77: 269-278
- [10] Shima H, Pende M, Chen Y, et al. Disruption of the p70S6k/p85S6k gene reveals a small mouse phenotype and a new functional S6 kinase [J]. *Embo J*, 1998, 17: 6649-6659
- [11] Pearson RB, Dennis PB, Han JW, et al. The principal target of rapamycin-induced p70 S6k inactivation is a novel phosphorylation site within a conserved hydrophobic domain [J]. *Embo J*, 1995, 14: 5279-5287
- [12] Nissim Hay, Nahum Sonenberg. Upstream and downstream of mTOR [J]. *Genes& Development*, 2016, 18: 1926-1945
- [13] Gingras AC, Gygi SP, Raught B, et al. Regulation of 4E-BP1 phosphorylation: a novel two-step mechanism [J]. *Genes*, 1999, 13: 1422-1437
- [14] Gingras AC, Raught B, Sonenberg N. eIF4 initiation factors: effectors of mRNA recruitment to ribosomes and regulators of translation [J]. *Annu Rev Biochem*, 1999, 68: 913-963
- [15] Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN2012[J]. *Int J Cancer*, 2015, 136(5): E359-E386
- [16] de Martel C, Maucourt-Boulch D, Plummer M, et al. World-wide relative contribution of hepatitis B and C viruses in hepatocellular carcinoma[J]. *Hepatology*, 2015, 62: 1190-1200
- [17] Welzel TM, Graubard BI, Quraishi S, et al. Population-attributable fractions of risk factors for hepatocellular carcinoma in the United States[J]. *Am J Gastroenterol*, 2013, 108: 1314-1321
- [18] David B Shackelford, Reuben J Shaw. The LKB1-AMPK pathway: metabolism and growth control intumor suppression [J]. *Nat Rev Cancer*, 2009, 9(8): 563-575
- [19] Katharina Willuweit, Andreas Heinold, Jassin Rashidi-Alavijeh, et al. Immunosuppression with mTOR inhibitors prevents the development of donor-specific antibodies after liver transplant [J]. *Clin Transplant*, 2017 [Epub ahead of print]
- [20] Mi C, Ma J, Wang KS, et al. Imperatorin suppresses proliferation and angiogenesis of human colon cancer cell by targeting HIF-1 α via the mTOR/p70S6K/4E-BP1 and MAPK pathways [J]. *Journal of Ethnopharmacology*, 2017, 203: 27-28 [Epub ahead of print]
- [21] Shirane M, Nakayama KI. Regulation of apoptosis and neurite extension by FKBP38 is required for neural tube formation in the mouse[J]. *Genes to Cells*, 2008, 13: 635-651
- [22] Nakatani T, Roy G, Fujimoto, et al. Sex hormone dependency of diethyl nitrosamine induced liver tumors in mice and chemoprevention by leuprorelin [J]. *Jpn J Cancer Res*, 2001, 92(3): 249-256
- [23] Yongbing Zhao, Zhaoyu L. Interplay of estrogen receptors and FOXA factors in the liver cancer [J]. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 2015, 418(3): 334-339
- [24] Fu YT, Zheng X, He Q, et al. Silencing FKBP38 gene by siRNA induces activation of mTOR signaling in goat fetal fibroblasts [J]. *Genet Mol Res*, 2015, 14(3): 9675-9682
- [25] Yoon MS, Sun Y, Arauz E, et al. Phosphatidic acid activates mammalian target of rapamycin complex 1 (mTORC1) kinase by displacing FK506 binding protein 38 (FKBP38) and exerting an allosteric effect [J]. *J Biol Chem*, 2011, 286(34): 29568-29574
- [26] Blaskovich MA, Yendluri V, Lawrence HR, et al. Lysophosphatidic acid acyltransferase beta regulates mTOR signaling [J]. *PLoS One*, 2013, 8(10): e78632