

小鼠 14-3-3 ϵ 蛋白基因的克隆及其真核表达载体的构建^{*}

孟 峻,侯艳军,唐 韬,张永梅,刘 珊,刘 洋,呼格吉乐(内蒙古医科大学附属医院检验科,呼和浩特 010050)

【摘要】 目的 构建小鼠 14-3-3 ϵ 真核表达载体 pcDNA3.1-ZEO-HA-14-3-3 ϵ ,并观察其在真核细胞中的表达。**方法** 通过反转录-聚合酶链反应从小鼠肝组织中获得编码 14-3-3 ϵ 的 cDNA,定向克隆至真核表达载体 pcDNA3.1-ZEO(+)中,经酶切和测序鉴定正确后,应用脂质体转染 HEK293 细胞,并通过蛋白免疫印迹检测细胞内 14-3-3 ϵ 的表达。**结果** 构建了真核表达载体 pcDNA3.1-ZEO-HA-14-3-3 ϵ ,将其转染 HEK293 细胞 48 h 后,蛋白免疫印迹检测到细胞内 14-3-3 ϵ 的表达。**结论** 成功构建了真核表达载体 pcDNA3.1-ZEO-HA-14-3-3 ϵ ,为研究 14-3-3 ϵ 在小鼠卵母细胞和小鼠-细胞受精卵 G2/M 转换中作用的研究奠定了基础。

【关键词】 14-3-3 ϵ 蛋白; HEK293 细胞; 真核表达载体

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2015.24.001 文献标志码:A 文章编号:1672-9455(2015)24-3611-03

Gene cloning of mouse 14-3-3 ϵ and construction of its eukaryotic expression vector^{*} MENG Jun, HOU Yan-jun, TANG Tao, ZHANG Yong-mei, LIU Shan, LIU Yang, Hujegile(Department of Clinical Laboratory, Affiliated Hospital of Inner Mongolia Medical University, Hohhot, Inner Mongolia 010050, China)

【Abstract】 Objective To construct mouse's eukaryotic expression vector pcDNA3.1-ZEO-HA-14-3-3 ϵ , and to examine its expression in vitro. **Methods** Total RNA was extracted from mouse liver tissue and reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) was performed to obtain the cDNA fragment encoding 14-3-3 ϵ , which was inserted into the pcDNA3.1-ZEO(+)vector. And the new construct, pcDNA3.1-ZEO-HA-14-3-3 ϵ was confirmed by restriction enzyme digestion and DNA sequencing. HEK293 cells were transfected with the pcDNA3.1-ZEO-HA-14-3-3 ϵ vector and pcDNA3.1-ZEO(+) vector, respectively. The expression of 14-3-3 ϵ was detected by Western blotting. **Results** The eukaryotic expression vector pcDNA3.1-ZEO-HA-14-3-3 ϵ was constructed, and 14-3-3 ϵ expression was detected in the HEK293 cells 48 h after transfection. **Conclusion** The eukaryotic expression vector pcDNA3.1-ZEO-HA-14-3-3 ϵ was constructed successfully, which would lay the foundation for the mechanism research of 14-3-3 ϵ in the G2/M transformation of mouse oocyte and oosperm.

【Key words】 14-3-3 ϵ protein; HEK293 cell; eukaryotic expression vector

14-3-3 蛋白家族是一组高度保守的可溶性酸性蛋白质,相对分子质量为 $(28\sim 33)\times 10^3$,广泛分布于各种真核细胞中^[1]。14-3-3 蛋白不仅是一种存在于脑组织中的蛋白,而且也广泛存在于其他各种组织中。14-3-3 蛋白高度保守,在哺乳动物发现 7 个家族成员,分别为 β 、 γ 、 ϵ 、 σ 、 ζ 、 τ 和 η ,并且有 7 个不同的基因编码,果蝇、酵母只有两种基因编码,植物有 13 种基因编码 14-3-3 蛋白^[2]。14-3-3 作为一个二聚体蛋白家族,调控蛋白质之间的相互作用,广泛参与细胞信号转导、周期进程、生长增殖、分化凋亡和扩展迁移。

1 材料与方法

1.1 材料 细胞株、菌种和质粒:克隆载体 pGEM-T vector 为 Promega 公司产品;真核表达载体 pcDNA3.1-ZEO 为 Invitrogen 公司产品;E. coli DH5 α 感受态菌株、HEK293 细胞购自北京全式金生物技术有限公司。

1.2 试剂与仪器 DMEM 培养基(GIBCO 公司产品);TRIzol 试剂、LipofectamineTM 2000 为美国 Invitrogen 公司产品;限制性核酸内切酶(XhoI、BamHI、XbaI、EcoRI)及 Pfu DNA Polymerase 为 MBI 公司产品;质粒 DNA 小提取试剂盒(上海

生工生物有限公司产品);DNA 凝胶回收试剂盒(大连宝生物公司产品);T4 DNA 连接酶为 New England Biolab 公司产品;鼠抗兔 14-3-3 ϵ 单克隆抗体(Abcam)、 β -Actin 抗体(Santa Cruz)、兔来源 HA 标签单克隆抗体为 Sigma 公司产品。聚合酶链反应(PCR)扩增引物的合成由 Invitrogen 公司完成,DNA 测序均由上海生工公司完成。基因扩增仪(Biometra,德国);低温超速离心机(Sigma,美国);台式高速离心机(TG16-WS,上海卢湘仪离心机仪器有限公司);电泳仪、电泳槽 0.75ram 垂直板(美国 Bio-tad 公司);凝胶自动成像仪 GDS8000 (BIORAD,美国);紫外分光光度计(PYE-UNICAM SPECTRONIC 公司,美国);细菌培养箱、空气浴振荡器(上海艾测电子科技有限公司);CO₂ 培养箱 CBI5(WTB-binder,德国)。

1.3 方法

1.3.1 引物设计 为了构建 HA 标签的 14-3-3 ϵ 表达载体,在编码 14-3-3 ϵ cDNA 起始密码上游加上 HA 的编码序列,Forward primer:5'-ATG TAC CCA TAC GAT GTT CCA GAT TAC GCT GAT GAT CGG GAG GAT CT-3',reverse primer:5'-GCT TTT ATT TCG TCT CAC TGA TTC TCA TCT

^{*} 基金项目:国家自然科学基金资助项目(81360109);内蒙古自然科学基金资助项目(2013MS1163)。

作者简介:孟峻,男,博士,主任技师,主要从事生物化学和分子生物学研究。

T-3'。

1.3.2 提取总 RNA 将小鼠颈椎脱位处死,剪开腹部,取其肝组织约 30 mg。将 30 mg 肝组织移入 2 mL 直筒离心管中,加入 Trizol 1 mL,剪碎肝组织,电动匀浆,匀浆后 4 ℃ 12 000 g 离心 1 min 去除不溶物。取上清液,移入 1.5 mL EP 管中,液体量约为 1 mL,加入 0.2 mL 氯仿,剧烈振荡 15 s,室温静置 2 min。4 ℃ 12 000 g 离心 15 min,吸取上层水相至另一新 EP 管中,加入异丙醇 0.5 mL,室温静置 10 min,4 ℃ 10 000 g 离心 10 min,离心后管底见明显白色胶样沉淀,弃上清液,加入 75%乙醇 1 mL,温和振荡离心管,悬浮沉淀。4 ℃ 7 500 g 离心 5 min,尽量弃上清液。室温晾干 15 min(直至没有明显乙醇液体),加 50 μ L DEPC H₂O 溶解 RNA 样品,用吸管反复吹打溶解 RNA,测 A 值定量 RNA 浓度。

1.3.3 反转录 PCR(RT-PCR)合成目的 cDNA 片段 反应体系为 50 μ L:2 $\times$ 反应混合物 25 μ L、模板 RNA 10 μ L、正向/反向引物(10 μ mol/L)各 1 μ L、反转录 Taq Mix 1 μ L、去 RNA 酶水 12 μ L。反应条件:94 ℃ 预变性 3 min,94 ℃ 变性 45 s,55 ℃ 退火 45 s,72 ℃ 延伸 45 s,反应 35 个循环,72 ℃ 延伸 5 min。

1.3.4 PCR 产物的回收和纯化 琼脂糖电泳检测 PCR 产物大小,在紫外灯下切出琼脂糖胶块中的目的 DNA,切碎胶块后,加入适量 Binding Buffer II,55 ℃ 水浴将胶块完全熔化,然后移入 UNIQ10 柱中,8 000 r/min 离心 1 min,弃滤液。加入 Wash Solution,离心 1 min,弃滤液,将柱子放入同一收集管中,重复此过程。12 000 r/min 再次离心 15 s,在 UNIQ10 柱子上加入适量的提前 65 ℃ 预热的 Elution Buffer,室温静置、离心,离心管中液体即为含有 HA-14-3-3 ϵ 的 cDNA 片段。取少量样品进行琼脂糖凝胶电泳,检测回收质量,并测定 A260/A280。

1.3.5 目的基因与 T 载体的连接及其鉴定 纯化的 PCR 产物与 pGEM-T 载体连接,反应体系为 10 μ L,HA-14-3-3 ϵ 的 cDNA 2 μ L、2 $\times$ 快速连接缓冲液 5 μ L、T 载体 1 μ L、T4 DNA 连接酶 1 μ L、去 RNA 酶水 1 μ L。16 ℃ 反应过夜,将连接后的载体转化到感受态大肠杆菌中,在 LB 培养基中增菌,37 ℃ 振荡培养 1 h 后,涂布于 Amp⁺琼脂平板培养基中,37 ℃ 过夜。挑取单菌落于 Amp⁺LB 培养基中培养 12~16 h,测其 A 值约 2~3 时用质粒提取试剂盒提取质粒。

1.3.6 用质粒提取试剂盒提取质粒 细菌培养液 1.5~5.0 mL,12 000 r/min 离心 2 min,倒掉或吸干培养基,在菌体沉淀中加入 250 μ L Solution I,吸打或振荡至彻底悬浮菌体。加入 250 μ L Solution II,立即温和颠倒离心管 5~10 次混匀,室温静置 2~4 min,加入 350 μ L Solution III,立即温和颠倒离心管 5~10 次混匀,12 000 r/min 离心 10 min,将上清液全部小心移入吸附柱,8 000 r/min 离心 30 s,倒掉收集管中的液体,在吸附柱中加入 500 μ L Wash Solution,10 000 r/min 离心 1 min,倒掉收集管中的液体,再用 500 μ L Wash Solution 洗一次,10 000 r/min 离心 1 min,空吸附柱,12 000 r/min 离心 2 min,将吸附柱放入干净的 1.5 mL 离心管中,在吸附膜中央加入 50~100 μ L Elution buffer,室温静置 2 min,10 000 r/min 离心 1 min,将所得质粒 DNA 溶液置于-20 ℃ 保存。

1.3.7 质粒的酶切鉴定 质粒用限制性内切酶 EcoRI 单酶切,酶切反应体系如下:10 $\times$ 缓冲液 1 μ L、pGEM-T/HA-14-3-3 ϵ 1 μ L、EcoRI 0.5 μ L、双蒸水 7.5 μ L、总体积 10 μ L。37 ℃ 90 min,琼脂糖电泳(胶的浓度为 1.5%)检测酶切条带,选择酶

切条带片段大小与预期相符合的阳性克隆保存,然后进行 DNA 测序分析。

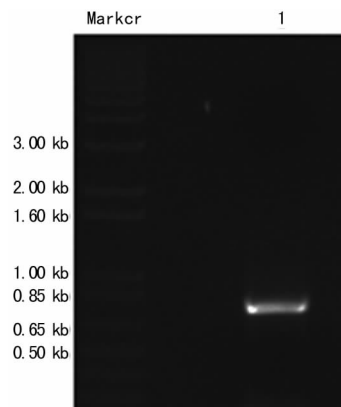
1.3.8 表达载体的构建及鉴定 经测序鉴定正确的阳性克隆与 pcDNA3.1-ZEO(+)载体用 EcoRI 单酶切后进行连接反应,酶切反应体系为 20 μ L:pGEM-T/HA-14-3-3 ϵ (或 pcDNA3.1-ZEO(+))2 μ L、10 $\times$ 缓冲液 2 μ L、EcoRI 1 L、双蒸水 15 L。37 ℃ 过夜,消化完的 pcDNA3.1-ZEO(+)加 1 μ L CIP,37 ℃ 水浴 60 min 去磷酸基,然后进行琼脂糖凝胶电泳(胶的浓度为 1.5%),分别从分离胶中回收 HA-14-3-3 ϵ 片段、pcDNA3.1-ZEO(+)载体,分别测定回收片段相应的浓度。连接反应的反应体系为 20 μ L(HA-14-3-3 ϵ cDNA 与 pcDNA3.1-ZEO(+))按摩尔比 3:1 混合:10 $\times$ T4 连接酶缓冲液 2 μ L、目的产物、pcDNA3.1-ZEO(+),T4 DNA 连接酶 1 μ L。16 ℃ 反应过夜,将反应的连接产物转化到感受态大肠杆菌,挑选单菌落进行培养,用质粒提取试剂盒提取质粒。质粒用 EcoRI 单酶切鉴定,选择酶切条带片段大小与预期相符合的阳性克隆保存,进一步行质粒 DNA 序列测定分析,构建成 pcDNA3.1-ZEO-HA-14-3-3 ϵ 表达载体。

1.3.9 细胞培养和转染 HEK293 细胞用 DMEM 培养液(添加 10%胎牛血清,100 U/mL 青霉素,10 μ g/mL 链霉素)培养。用 LipofectamineTM2000 按说明书进行转染 HEK293 细胞。将 HEK293 细胞分散于 100 mm 的培养皿(2 $\times$ 10⁶ 细胞/皿,10 mL 含 10% FBS 培养液/皿)。在 24 h 后,细胞共转染 5 μ g pcDNA3.1-ZEO-HA-14-3-3 ϵ DNA。

1.3.10 蛋白免疫印迹检测 14-3-3 ϵ 的表达 转染细胞 48 h 后离心去除培养液,加入 SDS 样品缓冲液,裂解细胞提取总蛋白,用 BCA 蛋白定量试剂盒定量,进行 12%十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳分离蛋白,转膜,5%脱脂奶粉封闭,分别用一抗(鼠抗兔 HA 标签抗体,鼠抗羊 β -Actin 单克隆抗体)及羊抗鼠二抗进行孵育,洗膜后,ECL 化学发光法显影成像。

2 结 果

2.1 小鼠 14-3-3 ϵ cDNA 的克隆及鉴定 提取小鼠肝组织细胞总 RNA,琼脂糖电泳检测总 RNA 的提取情况。用 RT-PCR 反转录出 14-3-3 ϵ cDNA,PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳(胶的浓度为 1.5%),14-3-3 ϵ cDNA 片段大小为 809 bp,结果在大约 800 bp 的位置可见特异性目的条带(图 1),与预期结果完全一致。

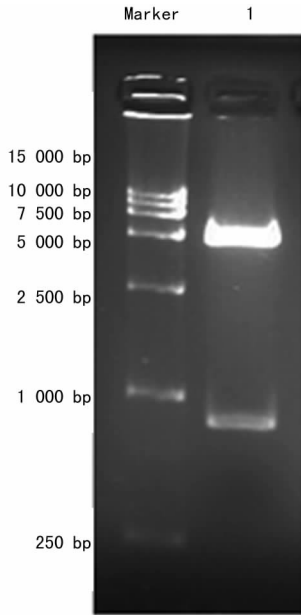


注:1 为 RT-PCR 产物;Marker 为 DNAmarkerDL10 kb。

图 1 RT-PCR 产物琼脂糖凝胶电泳分析

2.2 真核表达载体 pcDNA3.1-ZEO-HA-14-3-3 ϵ 的构建及鉴定 HA-14-3-3 ϵ 片段与 T 连接,阳性克隆经测序鉴定基因插

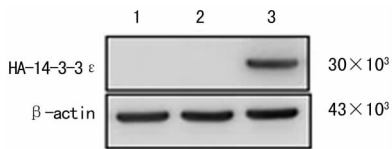
入正确。挑选鉴定正确的克隆 pGEM-T/HA-14-3-3 ϵ 和 pcDNA3.1-ZEO(+)载体均以 EcoR I 单酶切后连接,连接产物经限制性内切酶 EcoR I 酶切鉴定,结果见图 2。电泳结果显示 800 bp 相应的目的条带和 5 000 bp 的载体条带,与预期片段大小相符,经测序进一步证明插入基因正确,获得 pcDNA3.1-ZEO-HA-14-3-3 ϵ 载体,用于体外转录。



注:1 为 pcDNA3.1-ZEO-HA-14-3-3 ϵ 质粒 DNA 的单酶切产物; Marker 为 DNAMarkerDL15 kb。

图 2 pcDNA3.1-ZEO-HA-14-3-3 ϵ 质粒 DNA 的单酶切结果

2.3 真核表达载体 pcDNA3.1-ZEO-HA-14-3-3 ϵ 在 HEK293 细胞中的表达 通过脂质体介导的基因转染方法将构建的载体 pcDNA3.1-ZEO-HA-14-3-3 ϵ 转染 HEK293 细胞,用 anti- β -Actin 抗体和 anti-HA 标签抗体进行 Western blotting 检测,结果显示,在转染了真核表达载体 pcDNA3.1-ZEO-HA-14-3-3 ϵ 的 HEK293 细胞内,HA-14-3-3 ϵ 有表达(图 3)。提示真核表达载体 pcDNA3.1-ZEO-HA-14-3-3 ϵ 已成功构建并能正确表达 14-3-3 ϵ 。



注:1 为未转染组;2 为转染空载体 pcDNA3.1-ZEO;3 为转染重组体 pcDNA3.1-ZEO-HA-14-3-3 ϵ 。

图 3 Western blot 检测真核表达载体 pcDNA3.1-ZEO-HA-14-3-3 ϵ 在 HEK293 细胞中的表达

3 讨论

14-3-3 蛋白是一类广泛存在于真核生物体内,相对分子质量为 $(28\sim 33)\times 10^3$ 的酸性蛋白质。14-3-3 蛋白家族成员是在 1967 年由 Moore 和 Perez 首次在哺乳动物的脑组织中发现并鉴定,按照蛋白质系统分类命名法命名为 14-3-3 蛋白。14-3-3 蛋白自我聚集成同或异二聚体,一些家族成员,如 σ 和 γ 偏嗜形成同二聚体,其他家族成员如 ϵ 偏嗜形成异二聚体。14-3-3 二聚体能和细胞内许多蛋白质相互作用,包括许多转录因子、信号分子、凋亡因子和肿瘤抑制因子。功能涉及细胞生长、细胞周期限制点调控、信号转导。14-3-3 蛋白能和许多具有特殊

磷酸化的丝/苏氨酸结合活性的蛋白质相互作用。14-3-3 结合蛋白有 2 个高亲和 14-3-3 蛋白结合域:RSXpSXP(mode1)和 RXXXpSXP(mode2),pS 代表磷酸化的丝氨酸或苏氨酸,X 指除半胱氨酸以外的任何一种氨基酸。另外 14-3-3 蛋白能结合 RXXpSX-COOH 模式^[3-4]。通常与 14-3-3 蛋白相结合的靶蛋白都具有丝氨酸或苏氨酸位点,14-3-3 蛋白以其特有的保守模式与被磷酸化的丝氨酸或苏氨酸相结合,从而调节靶蛋白的生理活性^[1]。到目前为止,已经鉴定出超过 300 种 14-3-3 人类结合蛋白,而且还有继续增多的趋势^[5]。14-3-3 蛋白能进行磷酸化修饰,当 Ser-58 磷酸化后 14-3-3 蛋白由二聚体转变成单体,单体蛋白不稳定,在结合和调节磷酸化蛋白时活性降低或者完全失去活性^[6]。有研究显示,14-3-3 ϵ 分子共有 12 个磷酸化位点,而且每个磷酸化位点与其对应的生物学活性还不清楚^[7]。

有许多研究发现,14-3-3 蛋白在未受干扰的细胞周期进程中也发挥作用,例如,对发育中果蝇的研究发现,14-3-3 ζ 和 η 在细胞周期的调控中也发挥着作用,主要是通过抑制 CDC2 活性,使细胞在适当的时候退出有丝分裂。敲除果蝇的 14-3-3 ϵ 导致胚胎死亡,尽管 14-3-3 ϵ 表达正常,然而 14-3-3 ϵ 对胚胎的发育并不是必须的,14-3-3 ϵ 突变的胚胎细胞提前进入有丝分裂。

Uchida 等^[8] 研究结果显示,在 HEK293 细胞中 14-3-3 ϵ 能与 Cdc25B 的 309 位丝氨酸结合并控制 Cdc25B 的细胞质定位。在小鼠卵母细胞由 GV 期向 GVBD 过渡时 Cdc25B 从细胞质进入细胞核,使 Cdc2/cyclinB 复合体发生去磷酸化并激活,从而使小鼠卵母细胞恢复减数分裂,暗示在细胞质中 14-3-3 蛋白和 Cdc25B 的结合^[9-10]。

目前,国内少见小鼠 14-3-3 ϵ 真核表达载体的构建研究和 14-3-3 ϵ 在小鼠卵母细胞和受精卵发育中作用和机制的相关研究。本研究采用 RT-PCR 从小鼠肝组织中克隆小鼠 14-3-3 ϵ 基因,并成功构建 14-3-3 ϵ 真核表达载体 pcDNA3.1-ZEO-HA-14-3-3 ϵ 。通过脂质体介导的方法将 pcDNA3.1-ZEO-HA-14-3-3 ϵ 载体转染 HEK293 细胞后,Western blotting 证实转染细胞内 14-3-3 ϵ 的表达,为下一步研究 14-3-3 ϵ 基因的结构、功能及其在小鼠卵母细胞发育的调控作用奠定了良好的基础。

参考文献

- [1] Aitken A. 14-3-3 proteins; a historic overview[J]. Semin Cancer Biol, 2006, 16(3): 162-172.
- [2] Obsilova V, Silhan J, Boura E, et al. 14-3-3 proteins: a family of versatile molecular regulators[J]. Physiol Res, 2008, 57(Suppl 3): S11-S21.
- [3] Foote M, Zhou Y. 14-3-3 protein in neurological disorders[J]. Int J Biochem Mol Biol, 2012, 3(2): 152-164.
- [4] Coblitz B, Shikano S, Wu M, et al. C-terminal recognition by 14-3-3 proteins for surface expression of membrane receptors[J]. J Biol Chem, 2005, 280(43): 36263-36272.
- [5] Mackintosh C. Dynamic interactions between 14-3-3 proteins and phosphoprotein regulate diverse cellular processes[J]. Biochem J, 2004, 15(381): 329-342.
- [6] Sluchanko N, Gusev N. Oligomeric structure of 14-3-3 protein: what do we know about monomers[J]. FEBS Lett, 2012, 586(24): 4249-4256.
- [7] 李子健, 何鑫, 潘晨宇, 等. 14-3-3 ϵ 蛋白(下转第 3616 页)

(灵敏度低,针对阴道镜阴性但高度怀疑宫颈癌的患者);(5)鳞状上皮细胞抗原检测(仅针对年轻患者的早期诊断有参考意义);(6)阴道超声检查(特异性差,不易与慢性宫颈炎、宫颈息肉等良性病变相鉴别)。宫颈癌的早期筛查方法虽然众多,但都存在一定的方法学缺陷,故寻找新的血清学筛查指标很有必要。

PP2A 全酶由异三聚体构成,包括结构亚基-A 亚基、调节亚基-B 亚基和催化亚基-C 亚基^[7]。其作为一种丝/苏氨酸磷酸酶,能对蛋白进行可逆性磷酸化修饰,参与了细胞代谢、DNA 修复、基因表达、信号转导、细胞周期、细胞分化及凋亡,与肿瘤的发生密切相关,其在机体能拮抗大多数蛋白激酶的活性,有望成为肿瘤筛查新的靶标分子^[8-9]。本研究结果显示,hsHPV 感染和宫颈癌患者血清中 PP2A 水平均显著下调,且宫颈癌患者血清中 PP2A 水平下调更显著,该研究结果提示血清学 PP2A 联合 hsHPV 水平检测可能是宫颈癌早期诊断的良好指标。

蛋白磷酸 2A 的癌性抑制因子(CIP2A)作为一种与 PP2A 相互作用的内源性蛋白,在恶性肿瘤中可以负性调节 PP2A 活性^[10]。其在多数良性组织中不表达或者低表达,而在多种恶性肿瘤中均为高表达,包括胃癌、乳腺癌、肺癌、卵巢癌、前列腺癌、食管癌、肝癌等。而 PP2A 正好与之相反,更进一步证实了 PP2A 的抗肿瘤功能。PP2A 通过以下机制抑制肿瘤发生:(1)自身突变;(2)抑制蛋白激酶 B 活性;(3)调节 Raf 活性;(4)抑制 S6K 活性;(5)影响 c-Myc 稳定性;(6)调控 p53;(7)激活 Rb 家族;(8)调控 Wnt 信号通路。在人类黑色素瘤、肺癌、乳腺癌、神经胶质瘤、结肠瘤、人类多发性骨髓瘤和上皮鳞状细胞癌等恶性肿瘤的癌细胞内均已发现了 PP2A 水平下调,但是 PP2A 与宫颈癌的相关性研究较少^[11]。最新的研究进展表明,CIP2A 是通过抑制 PP2A 对 c-Myc 蛋白第 62 位丝氨酸去磷酸化稳定 c-Myc 的表达水平,维持细胞恶性表型,抑制细胞衰老和凋亡,促进细胞增殖和恶性转化。本研究结果显示,hsHPV 感染和宫颈癌患者组织 PP2A 酶活性显著下调,且宫颈癌患者组织 PP2A 酶活性下降更显著,该研究进一步证实了 hsHPV 和宫颈癌感染患者 PP2A 水平显著下调,血清 PP2A 水平可能成为宫颈癌良好的预测和诊断因子。

综上所述,本研究结果揭示了血清学 PP2A 联合 hsHPV 水平检测可能成为宫颈癌的良好预测和诊断靶标,该研究结果不仅为宫颈癌的发病分子机制提供了新的资料,而且可为临床宫颈癌的早期诊断提供新的靶点。

参考文献

- [1] Jemal A, Bray F, Center MM, et al. Global cancer statistics[J]. CA Cancer J Clin, 2011, 61(2): 69-90.
- [2] 孙小蓉, 李玉兰, 车冬缓, 等. 用细胞 DNA 定量分析方法进行宫颈癌普查的临床研究[J]. 诊断病理学杂志, 2005, 12(1): 12-16.
- [3] Sontag E. Protein phosphatase 2A: the trojan horse of cellular signaling[J]. Cell Signal, 2001, 13(1): 7-16.
- [4] Janssens V, Vanhoof C, Martens E, et al. Identification and characterization of alternative splice products encoded by the human phosphotyrosyl phosphatase activator gene[J]. Eur J Biochem, 2000, 267(14): 4406-4413.
- [5] Powell NG, Hibbitts SJ, Boyde AM, et al. The risk of cervical cancer associated with specific types of human papillomavirus: a case-control study in a UK population[J]. Int Cancer, 2011, 128(7): 1676-1682.
- [6] 王玉丰, 林玲, 刘春雨, 等. 三亚地区妇女人乳头瘤病毒感染的分子流行病学调查[J]. 检验医学, 2012, 27(8): 628-630.
- [7] 李天祝, 向本琼. 蛋白磷酸酶 PP2A 的结构及其肿瘤抑制因子功能[J]. 生物化学与生物物理进展, 2009, 36(2): 133-136.
- [8] Janssens V, Rebollo A. The role and therapeutic potential of Ser/Thr phosphatase PP2A in apoptotic signalling networks in human Cancer cells[J]. Curr Mol Med, 2012, 12(3): 268-287.
- [9] Kalew P, Sablina AA. Protein phosphatase 2A as a potential target for anticancer therapy[J]. Anticancer Agents Med Chem, 2011, 11(1): 38-46.
- [10] Junttila MR, Puustinen P, Niemela M, et al. CIP2A inhibits PP2A in human malignancies[J]. Cell, 2007, 130(1): 51-62.
- [11] Woo MM, Salamanca CM, Symowicz J, et al. SV40 early genes induce neoplastic properties in serous borderline ovarian tumor cells[J]. Gynecol Oncol, 2008, 111(1): 125-131.

(收稿日期: 2015-03-25 修回日期: 2015-06-15)

(上接第 3613 页)

- 磷酸化修饰的生物质谱分析[J]. 分析化学, 2013, 41(11): 1653-1658.
- [8] Uchida S, Kuma A, Ohtsubo M, et al. Binding of 14-3-3beta but not 14-3-3sigma controls the cytoplasmic localization of CDC25B; binding site preferences of 14-3-3 subtypes and the subcellular localization of CDC25B[J]. J Cell Sci, 2004, 117(Pt 14): 3011-3020.
 - [9] Oh JS, Han SJ, Conti M, Wee1B, Myt1, and Cdc25 func-

tion in distinct compartments of the mouse oocyte to control meiotic resumption[J]. J Cell Biol, 2010, 188(2): 199-207.

- [10] Xiao JY, Liu C, Hou JJ, et al. Ser149 is another potential PKA phosphorylation target of Cdc25B in G2/M transition of fertilized mouse eggs[J]. J Biol Chem, 2011, 286(12): 10356-10366.

(收稿日期: 2015-03-25 修回日期: 2015-06-15)