

文章编号: 1000-7423(2013)-01-0018-05

【论著】

酵母双杂交筛选与弓形虫毒力因子 ROP18 相互作用的宿主蛋白

都建^{1*}, 安然¹, 程里¹, 陈滢², 沈继龙³

【摘要】 目的 利用酵母双杂交方法, 筛选与弓形虫毒力因子 ROP18 相互作用的宿主蛋白。方法 RT-PCR 扩增弓形虫 RH 株速殖子 ROP18 基因片段, 扩增产物经双酶切后插入酵母双杂交诱饵载体 pGBKT7 中, 将重组质粒导入酵母 AH109 菌株中, 检测诱饵载体有无毒性和自激活作用, 利用酵母双杂交系统从人胚胎脑 cDNA 文库中筛选与 ROP18 相互作用的宿主蛋白。结果 构建了诱饵载体 pGBKT7-ROP18, ROP18 具有自激活功能。用 ROP18^{25-251aa} 为诱饵, 筛选获得一系列与 ROP18 相互作用的宿主蛋白: DNA 损伤特异性结合蛋白 1 (DDB1)、torsin A 相互作用蛋白 1 (TOR1AIP1)、整联蛋白 β 1 (integrin β 1)、溶质运载蛋白 3 (SLC3A2)、酪氨酸硫化转移酶 2 (TPST2)、Der1 样域家族成员 2 (DERL2) 和 OCIA 结构域蛋白 1 (OCIAD1)。结论 通过酵母双杂交技术筛选出与弓形虫毒力因子 ROP18 相互作用的多种宿主蛋白。

【关键词】 弓形虫; ROP18^{25-251aa}; 酵母双杂交; 相互作用; 宿主蛋白

中图分类号: R382.5 文献标识码: A

Screening of Host Cell Proteins that Interact with *Toxoplasma gondii* ROP18 via Yeast Two-hybrid System

DU Jian^{1*}, AN Ran¹, CHENG Li¹, CHEN Ying², SHEN Ji-long³

(1 Department of Biochemistry and Molecular Biology, Anhui Medical University, Hefei 230032, China; 2 Department of Pharmacy, Hefei 230032, China; 3 Department of Microbiology and Parasitology, Anhui Provincial Key Laboratory of Genomic Research, Anhui Medical University, Hefei 230032, China)

【Abstract】 **Objective** To screen the host cell proteins that can interact with *Toxoplasma gondii* ROP18 by using yeast two-hybrid system. **Methods** The ROP18 gene fragments were amplified by RT-PCR from mRNA of *T. gondii* RH strain. The product of RT-PCR was digested with double restriction enzyme and was subcloned into the bait vector pGBKT7. The recombinant plasmid was transferred into yeast AH109 strain. Its toxicity and the autonomous activating activity were tested. The human fetal brain cDNA library was screened with pGBKT7-ROP18^{25-251aa} as the bait plasmid by yeast two-hybrid system. **Results** The bait was constructed and AH109/PGBKT7-ROP18 showed an autonomous activity. The yeast strain AH109/pGBKT7-ROP18^{25-251aa} line was then mated with the Mate & PlateTM Human Fetal Brain cDNA library. Using the selection procedures, eight novel host cell proteins were obtained: damage-specific DNA binding protein 1 (DDB1), torsin A interacting protein 1 (TOR1AIP1), integrin beta 1, solute carrier family 3 (SLC3A2), tyrosylprotein sulfotransferase (TPST2), OCIA domain containing 1 (OCIAD1), Der1-like domain family member 2 (DERL2), in addition to *Homo sapiens* activating transcription factor 6 beta (ATF6). **Conclusion** Eight novel host cell proteins have been obtained via yeast two-hybrid system, which can interact with TgROP18.

【Key words】 *Toxoplasma gondii*; ROP18^{25-251aa}; Yeast two-hybrid; Interaction; Host protein

Supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 81271864, 30801329), the Fok Ying Tung Colleges Young Teachers Fund (No. 131033) by Chinese Ministry of Education and the Outstanding Youth Fund of Anhui Province (No. 10040606Y19)

* Corresponding author, E-mail: dujane@163.com

基金项目: 国家自然科学基金 (No. 81271864, 30801329); 教育部霍英东教育基金会高等院校青年教师基金 (No. 131033); 安徽省杰出青年基金 (No. 10040606Y19)

作者单位: 1 安徽医科大学基础医学院生化与分子生物学教研室, 合肥 230032; 2 安徽医科大学药学院, 合肥 230032; 3 安徽医科大学省部级基因研究重点实验室, 病原生物学教研室, 合肥 230032

* 通讯作者, E-mail: dujane@163.com

弓形虫是一种细胞内寄生虫,引起世界范围传播的人兽共患弓形虫病,据估计全球近 1/3 人口感染弓形虫^[1,2],弓形虫在人体多为隐性感染,通常在免疫力低下或缺陷的人群,如长期化疗的癌症患者、器官移植者和 AIDS 患者中发病。孕早期感染弓形虫有 40% 的几率导致胎儿感染,可致流产、早产、死胎和胎儿畸形,或影响其出生后的生长发育和智力水平,严重影响优生优育^[3,4]。菌株杂交实验、基因组数量特征分析和转基因弓形虫试验联合证明,ROP18 可提高弓形虫的增殖分裂速度,并对感染动物有致死作用,是弓形虫的毒力因子^[5-8],因此,本研究采用酵母双杂交法筛选与 ROP18 相互作用的宿主蛋白,对于寻找有效的靶点和弓形虫病的预防控制具有重要意义。

材料与方法

1 材料

1.1 弓形虫株、质粒来源 刚地弓形虫 RH 株速殖子由中山医科大学陈观今教授惠赠,由本室传代、保种。质粒 pGBKT7 和 pGADT7 系中国科学技术大学姚雪彪教授惠赠。

1.2 主要试剂和仪器 RNA 提取试剂盒购自美国 Gibco 公司,酵母菌株 AH109、酵母培养基 (YPD) 和人胚胎 cDNA 文库 (Y187/pACT2) 均购自美国 Clontech 公司,异亮氨酸 (isoleucine) 等 15 种氨基酸购自美国 Sigma 公司,大肠埃希菌 (*E. coli*) 质粒提取试剂盒和 DNA 电泳回收试剂盒均购自美国 Axygen 公司,PCR 试剂盒、限制性内切酶 *Bam*H I、*Pst* I 和 *Bgl* II 购自宝生物 (大连) 工程有限公司,化学发光检测试剂 (ECL) 购自美国 Amersham 公司。SD/-Trp/-Leu/-His 是缺乏色氨酸 (Trp)、亮氨酸 (Leu)、组氨酸 (His)、腺嘌呤 (Ade) 的 SD 培养基。

2 方法

2.1 质粒的构建 根据 ROP18 基因全长编码序列 (GenBank 登录号为 AM075204.1) 设计上游引物和下游引物,分别为: 5'-ATGTTTTCGGTACAGCGGC-CACCTCTT-3', 5'-TTATTCTGTGTGGAGATGTTTCCT-GCTGTTTC-3', 按照 Trizol 试剂盒说明书制备弓形虫 RH 株速殖子总 RNA, RT-PCR 克隆 ROP18 的 ORF 片段,将纯化的 PCR 产物克隆至 pGBKT7 载体作为“诱饵”质粒,同时构建 ROP18 去除激酶激活域的缺失突变体 pGBKT7-ROP18^{25-251aa},将其克隆至 pGBKT7 载体作为对照“诱饵”质粒用于自激活检测。将人胚胎大脑 cDNA 文库构建于 pGADT7 载体,作为“猎物”质粒。

2.2 酵母双杂交 按美国 Clontech 公司酵母双杂交操作手册进行,采用醋酸锂转化法,将 AH109 单克隆接种于 50 ml 酵母培养基中,30 °C 振荡培养至吸光度 (A_{600} 值) 为 0.4~0.6,收集酵母菌体重悬于 1.5 ml 1×TE 醋酸锂溶液 (TE/LiAc),即为酵母感受态细胞。将诱饵质粒 pGBKT7-ROP18^{25-251aa} 加入酵母感受态细胞中,混匀后加入 0.5 ml PEG 醋酸锂溶液 (PEG/LiAc),30 °C 200 rpm 振荡培养 30 min,加入二甲基亚砜混匀,42 °C 水浴 15 min,冰浴 2 min,700×g 离心 5 min,收集菌体铺于营养缺陷型选择培养基 (SD/-Trp/-Leu/-His/Ade) 上,30 °C 培养至带有诱饵质粒的酵母克隆长出。

2.3 蛋白质印迹分析 (Western blotting) 取转化过 pGBKT7-ROP18^{25-251aa} 的 AH109 菌株的单克隆接种于 5 ml SD 缺陷培养基 (SD/-Trp/-Leu/-His),同时取未转化的 AH109 菌株单克隆接种于 5 ml 酵母培养基作对照,用玻璃珠 (美国 Sigma 公司) 法提取酵母蛋白,蛋白经 SDS-PAGE 后,转移到 PVDF 膜上,5% 脱脂牛奶封闭 1 h 后,与 c-myc 标签抗体孵育,化学发光法显示结果。

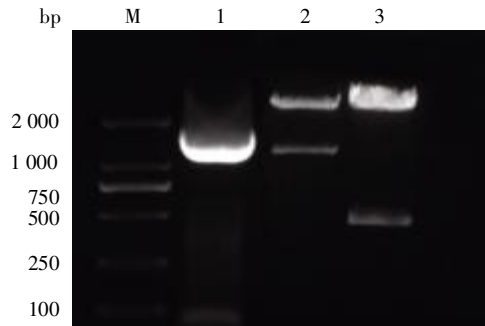
2.4 人胚胎脑 cDNA 文库的筛选 挑取直径 2~3 mm、生长状态良好的 AH109/AH109/pGBKT7-ROP18^{25-251aa} 菌落接种于 50 ml 酵母培养基,扩大培养后,将菌落沉淀与含人胚胎脑 cDNA 文库质粒文库的 Y187/pACT2 共同接种于 50 ml 2×含卡那霉素抗性的酵母蛋白胍右旋葡萄糖腺嘌呤培养基 (YPDA/Kan),30 °C 250 r/min 温育 20 h,倒置显微镜观察二倍体形成情况,将培养物离心重悬于 10 ml 0.5×酵母蛋白胍右旋葡萄糖腺嘌呤培养基 (YPDA),按 100 μl/板将所有培养物涂于 SD/-Trp/-Leu/-His/Ade,30 °C 倒置培养,直至菌落出现。

2.5 测序与分析 将排除假阳性后的文库质粒,采用内切酶 *Bgl* II 进行酶切后,1% 琼脂糖凝胶电泳,根据片段大小等特征进行分类。将分类后的文库质粒,以 Primer AD (Clontech 公司试剂盒提供) 为引物进行测序,通过 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> 对所得基因序列进行同源性分析。

结 果

1 ROP18 基因扩增和诱饵质粒的酶切验证

PCR 扩增弓形虫 RH 株 ROP18 基因,在 1 665 bp 处有单一的 DNA 片段,与预期大小一致。pGBKT7-ROP18 和 pGBKT7-ROP18^{25-251aa} 经 *Bam*H I/*Pst* I 双酶切后均得到两条大小分别为 1 665 bp 和 678 bp 的条带,与预期大小一致 (图 1)。



M: DNA 标志物; 1: ROP18; 2: pGBKT7-ROP18 *Bam*H I /*Pst* I 酶切产物; 3: pGBKT7-ROP18^{25-251aa} *Bam*H I /*Pst* I 酶切产物。

M: DNA marker; 1: ROP18; 2: pGBKT7-ROP18 digested with *Bam*H I and *Pst* I; 3: pGBKT7-ROP18^{25-251aa} digested with *Bam*H I and *Pst* I.

图 1 弓形虫 ROP18 基因, pGBKT7-ROP18 和 pGBKT7-ROP18^{25-251aa} 酶切鉴定结果

Fig.1 Agarose gel electrophoresis analysis of full-length ROP18 RT-PCR products of pGBKT7-ROP18 and pGBKT7-ROP18^{25-251aa} digested with double restriction enzyme

2 诱饵蛋白 ROP18 毒性和自激活检测

自激活实验发现, ROP18 全长有自激活活性。而将 pGBKT7-ROP18^{25-251aa} 转入酵母 AH109 中, 在 SD/-Trp/-His 固体平板上无法生长, 说明 C-末端蛋白激酶域是自激活活性必需的 (图 2A、B), 因此将 pGBKT7-ROP18^{25-251aa} 作为诱饵质粒用于酵母双杂交系统筛选 ROP18 的相互作用蛋白。ROP18 在 C 末端有一蛋白激酶结构域, N 端有一信号肽, 实验发现激酶结构域会引起自激活, 因此, 又构建了去除激酶域和信号肽的质粒 pGBKT7-ROP18^{25-251aa} 用于自激活检测 (图 2C)。

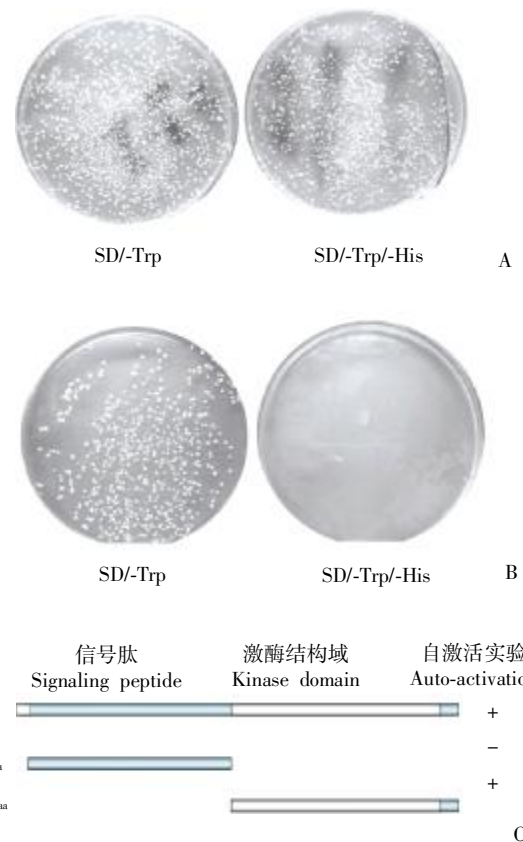
3 融合蛋白的表达

Western blotting 分析结果表明, AH109/pGBKT7-ROP18^{25-251aa} 酵母菌能高度稳定的表达融合蛋白, 相对分子质量 (M_r) 约为 45 750, 而阳性对照 AH109/pGBKT7 能表达一个约为 M_r 21 000 的融合蛋白, 而阴性对照则不表达 (图 3)。

4 筛选与弓形虫毒力因子 ROP18 相互作用的宿主蛋白

在接合培养 20 h 时, 倒置显微镜下观察到了三叶草状二倍体细胞 (图 4A、B), 说明酵母接合培养成功。在 SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade 平板上共挑取 57 个克隆, 反复传代 3 次并经 β -半乳糖苷酶显色检验后共获得 27 个克隆, 应用 *E. coli* DH10B 扩增并经 Amp 筛选获得 pACT2 文库质粒后, 再与 pGBKT7-ROP18^{25-251aa} 共转化 AH109, 得到阳性克隆 21 个。

利用 NCBI 的 BLAST 软件分析, 发现这 21 个阳



A: AH109/pGBKT7-ROP18 分别在 SD/-Trp 和 SD/-Trp/-His 培养基上的生长; B: AH109/pGBKT7-ROP18^{25-251aa} 分别在 SD/-Trp 和 SD/-Trp/-His 培养基上的生长; C: 酵母双杂交中编码诱饵蛋白的 ROP18 和其各片段示意图及自激活活性。

A: Growth of AH109/pGBKT7-ROP18 on SD/-Trp and SD/-Trp/-His mediums; B: Growth of AH109/pGBKT7-ROP18^{25-251aa} on SD/-Trp and SD/-Trp/-His mediums; C: Schematic drawing of ROP18 and its deletions that encode various bait clones used for yeast two-hybrid assays.

图 2 诱饵蛋白 ROP18 毒性和自激活检测
Fig 2 Determination of the autonomous activating activity of ROP18

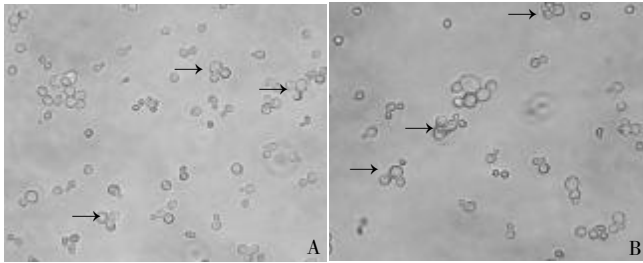


1: AH109/pGBKT7 裂解产物; 2: AH109/pGBKT7-ROP18^{25-251aa} 裂解产物; 3: AH109 裂解产物。

1: AH109/pGBKT7 lysate; 2: AH109/pGBKT7-ROP18^{25-251aa} lysate; 3: AH109 lysate.

图 3 ROP18^{25-251aa} 蛋白的表达
Fig.3 Expression of ROP18^{25-251aa}

性克隆中有 8 个克隆和已知的基因高度同源, 其中转录激活因子 ATF6 β 已被发现, 其他 7 个分别为 DNA



A: 20 h; B: 24 h; 箭头所示为三叶草状的二倍体细胞。

A: 20 h; B: 24 h; Arrow shows an example of a typical yeast zygote.

图 4 酵母融合情况

Fig. 4 Yeast fusion situation

损伤特异性结合蛋白 1 (DDB1)、torsin A 相互作用蛋白 1 (TOR1AIP1)、整联蛋白 β 1 (integrin β 1)、溶质运载蛋白 3 (SLC3A2)、酪氨酸硫化转移酶 2 (TPST2)、Der1 样域家族成员 2 (DERL2) 和 OCIA 结构域蛋白 1 (OCIAD1)(表 1)。

讨 论

酵母双杂交系统作为研究发现活细胞内蛋白质与蛋白质相互作用的一种方法,近几十年得到广泛应用。其基本原理是两个在结构上分开、功能上又相互独立的结构域,如本研究所用的 AD (转录激活域)

和BD (DNA 结合域),在同一活细胞内彼此接近,激活下游报告基因的表达^[3]。该技术不仅可应用于发现新的蛋白及其新功能,还可应用于抗体与抗原,以及药物与蛋白的相互作用。将诱饵蛋白与 Gal4 蛋白的一个结构域融合后,不能直接用于筛选另一结构域上表达文库,因为,如果诱饵蛋白本身对下游的报告基因有激活作用,则在文库筛选时会出现假阳性结果。本研究用含 ROP18 全长的重组质粒转化酵母菌,观察在 SD/-Trp 和 SD/-Trp/-His 平板上的生长情况,发现 ROP18 全长具有自激活作用,因此,要寻找并去除自激活必需的区域。实验发现,ROP18^{25-251aa} 作为诱饵无自激活活性,可利用其在人胚胎脑 cDNA 文库钓取与 ROP18 相互作用的蛋白。

弓形虫在入侵宿主细胞早期,虫体内的分泌细胞器(如棒状体和微线体)能将相应的蛋白分泌至纳虫空泡,其中棒状体蛋白在虫体入侵和纳虫空泡的形成和修饰过程中起着重要作用,是重要的入侵和毒力作用因子。ROP2 家族的 ROP18 具有丝氨酸-苏氨酸蛋白激酶结构,具有激酶活性,是决定毒力的关键分子^[58]。

本实验通过酵母双杂交系统发现 ROP18 的一些新的与宿主相互作用蛋白以及 ATF6 β 。研究发现 ATF6 β 是在内质网应激反应中涉及到的一种转录因

表 1 人胚胎大脑 cDNA 文库获得的阳性克隆的 BLAST 分析结果

Table 1 The BLAST results of positive clones obtained from the human fetal brain cDNA library

蛋白名称 Protein name	基因登录号 Accession number	克隆数 Number of clones	功能 Function description	同源性 Homology/%
DNA 损伤特异性结合蛋白 1 <i>Homo sapiens</i> damage-specific DNA binding protein 1 (DDB1)	NM_001923	5	参与核酸切除修复通路 (the NER pathway) 启动 DNA 修复过程 Nucleotide excision repair pathway (the NER pathway) to initiate DNA repair	100
torsin A 相互作用蛋白 1 <i>Homo sapiens</i> torsin A interacting protein 1	NM_015602	3	细胞膜黏附和核纤层组装 Membrane attachment and assembly of the nuclear lamina	98~99
整联蛋白 β 1 <i>Homo sapiens</i> integrin, beta 1	NM_133376	4	膜受体参与细胞黏附和识别,在胚胎形成、止血、组织修复、免疫反应和转移性肿瘤细胞的扩散中发挥作用 Membrane receptors involved in cell adhesion and recognition in a variety of processes including embryogenesis, hemostasis, tissue repair, immune response and metastatic diffusion of tumor cells	100
溶质运载蛋白 3 <i>Homo sapiens</i> solute carrier family 3 (SLC3A2)	NM_001013251	2	调节细胞内的钙含量和运输 L-型氨基酸 Regulation of intracellular calcium levels and transports L-type amino acids	99
酪氨酸硫化转移酶 2 <i>Homo sapiens</i> tyrosylprotein sulfotransferase2 (TPST2)	NM_003595	2	催化多肽的酸性模体中酪氨酸残基的硫酸化 Catalysis of the O-sulfation of tyrosine residues within acidic motifs of polypeptides	100
Der1 样域家族成员 2 <i>Homo sapiens</i> Der1-like domain family, member 2 (DERL2)	NM_016041	4	参与错误折叠糖蛋白的内质网相关降解过程 Component of endoplasmic reticulum-associated degradation (ERAD) for misfolded luminal glycoproteins	100
OCIA 结构域蛋白 1 <i>Homo sapiens</i> OCIA domain containing 1 (OCIAD1)	NM_001079842	1	参与细胞黏附 Potential involvement in cell adhesion	98
激活转录因子 6 β <i>Homo sapiens</i> activating transcription factor 6 beta (ATF6)	NT_007592	2	内质网应急中未折叠蛋白反应信号通路的转录因子 A transcription factor in the unfolded protein response(UPR) pathway during ER stress	100

子, 在弓形虫感染过程中, 是 ROP18 的一个作用靶点, 它的降解受到 ROP18 的调控^[9]。筛选结果也证实了 ROP18 和 ATF6 β 之间的相互作用。DDB1 在 DNA 修复中发挥着重要作用^[10], 它能与 DDB2 形成 UV-DDB 复合物而参与核算切除修复^[11,12], 它与 ROP18 的相互作用机制尚不清楚, 可能是修改宿主细胞 DNA 修复途径或细胞转录过程。整联蛋白是细胞表面一类重要的受体, 具有信号转导和联系细胞外微环境与细胞内代谢活动的功能, 从而对细胞生长、免疫应答、肿瘤发生、发展和转移等起着重要的调节作用, 与 ROP18 相互作用可能是参与内皮细胞运动和血管再生^[13,14]。TOR1AIP1 是一种宿主细胞核蛋白, 与 ROP18 相互作用可能涉及到宿主细胞核组装、染色质和细胞核膜动力^[15,16]。SLC3A2 是一种溶质运载蛋白家族, 能编码一种细胞膜跨膜蛋白, 以二聚体的重链和几种可能的轻链之一相结合出现, 重链是通过二硫键共价结合的, 因此在调节细胞内钙离子水平和 L-型氨基酸的运输发挥着重要作用^[17], SLC3A2 还会和整合蛋白 β 1 相互作用调节人角化细胞对基底膜的黏附^[18]。ROP18 与 TPST2 也能发生相互作用, TPST2 主要分布于膜片段、高尔基体和融入膜等, TPST 的作用是将结合于二磷酸腺苷的带负电荷的硫基团, 转移给酸性氨基酸附近的酪氨酸羟基^[19]。DERL2 主要分布在内质网, 融入内质网膜等, 对内质网糖蛋白的错误折叠的降解有一定的作用, ROP18 与 DERL2 的相互作用可能会有利于维持内质网的稳定^[20]。OCIAD1 对于卵巢癌细胞黏附有很关键的作用, 因此推测 ROP18 与 OCIAD1 的相互作用也参与细胞的黏附^[21], 但是 ROP18 与这些宿主蛋白作用发生的方式及其生理功能还有待进一步的验证和研究。

参 考 文 献

- [1] Peng HJ, Chen XG, Lindsay DS. A review: competence, compromise, and concomitance-reaction of the host cell to *Toxoplasma gondii* infection and development [J]. J Parasitol, 2011, 97(4): 620-628.
- [2] Wang T, Liu M, Gao XJ, et al. *Toxoplasma gondii*: the effects of infection at different stages of pregnancy on the offspring of mice[J]. Exp Parasitol, 2011, 127(1): 107-112.
- [3] Hide G, Morley EK, Hughes JM, et al. Evidence for high levels of vertical transmission in *Toxoplasma gondii*[J]. Parasitology, 2009, 136(14): 1877-1885.
- [4] Kim K, Weiss LM. *Toxoplasma*: the next 100 years [J]. Microbes Infect, 2008, 10(9): 978-984.
- [5] Saeji JP, Boyle JP, Collier S, et al. Polymorphic secreted kinases are key virulence factors in toxoplasmosis[J]. Science, 2006, 314(5806): 1780-1783.
- [6] Taylor S, Barragan A, Su C, et al. A secreted serine-threonine kinase determines virulence in the eukaryotic pathogen *Toxoplasma gondii*[J]. Science, 2006, 314(5806): 1776-1780.
- [7] Boothroyd JC, Dubremetz JF. Kiss and spit: the dual roles of *Toxoplasma* rhoptries[J]. Nat Rev Microbiol, 2008, 6(1): 79-88.
- [8] Sinai AP. The *Toxoplasma* kinase ROP18: an active member of a degenerate family[J]. PLoS Pathog, 2007, 3(2): e16.
- [9] Yamamoto M, Ma JS, Mueller C, et al. ATF6 β is a host cellular target of the *Toxoplasma gondii* virulence factor ROP18[J]. J Exp Med, 2011, 208(7):1533-1546.
- [10] Sun NK, Lu HP, Chao CC. Identification of rat DDB1, a putative DNA repair protein, and functional correlation with its damaged-DNA recognition activity [J]. J Biomed Sci, 2002, 9(4): 371-380.
- [11] Li J, Wang QE, Zhu Q, et al. DNA damage binding protein component DDB1 participates in nucleotide excision repair through DDB2 DNA-binding and cullin 4A ubiquitin ligase activity[J]. Cancer Res, 2006, 66(17): 8590-8597.
- [12] Iovine B, Iannella ML, Bevilacqua MA. Damage-specific DNA binding protein 1 (DDB1) is involved in ubiquitin-mediated proteolysis of p27Kip1 in response to UV irradiation [J]. Biochimie, 2011, 93(5): 867-875.
- [13] Urbinati C, Bugatti A, Giacca M, et al. α v β 3-integrin-dependent activation of focal adhesion kinase mediates NF-kappaB activation and mitogenic activity by HIV-1 Tat in endothelial cells [J]. J Cell Sci, 2005, 118(17): 3949-3958.
- [14] Urbinati C, Mitola S, Tanghetti E, et al. Integrin α v β 3 as a target for blocking HIV-1 Tat induced endothelial cell activation *in vitro* and angiogenesis *in vivo* [J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2005, 25(11): 2315-2320.
- [15] Dechat T, Korbei B, Vaughan OA, et al. Lamina-associated polypeptide 2 alpha binds intranuclear A-type lamins [J]. J Cell Sci, 2000, 113(19): 3473-3484.
- [16] Dhe-Paganon S, Werner ED, Chi Y, et al. Structure of the globular tail of nuclear lamin[J]. J Biol Chem, 2002, 277(20): 17381-17384.
- [17] Prager GW, Feral CC, Kim C, et al. CD98hc (SLC3A2) interaction with the integrin beta subunit cytoplasmic domain mediates adhesive signaling [J]. J Biol Chem, 2007, 282(33): 24477-24484.
- [18] Lemaître G, Stella A, Feteira J, et al. CD98hc (SLC3A2) is a key regulator of keratinocyte adhesion[J]. J Dermatol Sci, 2011, 61(3): 169-179.
- [19] Moore KL. The biology and enzymology of protein tyrosine O-sulfation[J]. J Bio Chem, 2003, 278(27): 24243-24246.
- [20] Oda Y, Okada T, Yoshida H, et al. Derlin-2 and Derlin-3 are regulated by the mammalian unfolded protein response and are required for ER-associated degradation [J]. J Cell Biol, 2006, 172(3): 383-393.
- [21] Sengupta S, Michener CM, Escobar P, et al. Ovarian cancer immuno-reactive antigen domain containing 1 (OCIAD1), a key player in ovarian cancer cell adhesion[J]. Gynecol Oncol, 2008, 109(2): 226-233.

(收稿日期: 2012-10-15 编辑: 衣凤芸)