

酵母双杂交法筛选组织蛋白酶 B 相互作用蛋白质

王道余¹, 赵胜娟², 刘燕¹, 刘森³, 冯利兴^{*3}

(1. 复旦大学 生命科学学院, 上海 200433; 2. 河南科技大学 食品与生物工程学院, 河南 洛阳 471023; 3. 中国科学院上海药物研究所, 上海 201203)

摘要: 组织蛋白酶 B 是肿瘤侵袭和转移密切相关的一种蛋白酶, 研究其作用网络对于开发基于组织蛋白酶 B 的抗肿瘤药物非常重要。采用酵母双杂交技术构建相关文库, 以人组织蛋白酶 B 作为诱饵蛋白质, 寻找其在肿瘤细胞中的直接相互作用蛋白质。在 84 个初始阳性克隆中, 共有 15 个能通过 3 个报告基因的检测。BLAST 分析发现, 在 GenBank 数据库中可以匹配 7 个基因, 编码 7 种已知的蛋白质: BCL2-associated athanogene 6 (BAG6), filaminA, alpha (FLNA), ras homolog family member G (RHOG), metallothionein 2A (MT2A), ZKD family zinc finger C (ZKDC), DEP domain containing 7 (DEPDC7), A kinase (PRKA) interacting protein 1 (AKIP1)。

关键词: 组织蛋白酶 B; 酵母双杂交文库筛选; 肿瘤; 侵袭; 转移

中图分类号: R 735.3 **文献标志码:** A **文章编号:** 1673-1689(2018)12-1255-06

Screening for Cathepsin B Interacting Proteins by Yeast Two-Hybrid System

WANG Daoyu¹, ZHAO Shengjuan², LIU Yan¹, LIU Miao³, FENG Lixing^{*3}

(1. School of Life Science, Fudan University, Shanghai 200433, China; 2. College of Food & Bioengineering, Henan University of Science and Technology, Luoyang 471023, China; 3. Shanghai Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 201203, China)

Abstract: Cathepsin B is an enzymatic protein that was closely related with tumor cell invasion and metastasis. The network of Cathepsin B is very important for research and development of new anticancer drug, for example, new Cathepsin B inhibitor. Using yeast two hybrid technique, the proteins that interacting with Cathepsin B were identified. Results: After screening analysis, 15 positive clones of putative interactions were obtained and they were identified by sequencing and utilizing of the data online (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). There were 7 genes including BCL2-associated athanogene 6 (BAG6), filamin A, alpha (FLNA), ras homolog family member G (RHOG), metallothionein 2A (MT2A), ZKD family zinc finger C (ZKDC), DEP domain containing 7 (DEPDC7), A kinase (PRKA) interacting protein 1 (AKIP1).

Keywords: Cathepsin B, yeast two hybrid library screening, tumor, invasion, metastasis

收稿日期: 2015-11-17

基金项目: 国家自然科学基金项目(81373964); 国家科技重大专项项目(2014ZX09301-306-03); 上海科技支撑项目(13431900401); 上海科技创新行动计划项目(15140904800)。

* 通信作者: 冯利兴(1983—), 男, 河北邯郸人, 助理研究员, 工学硕士, 主要从事药理学和蛋白质组学方面的研究。

E-mail: fenglixing2000@163.com

引用本文: 王道余, 赵胜娟, 刘燕, 等. 酵母双杂交法筛选组织蛋白酶 B 相互作用蛋白质[J]. 食品与生物技术学报, 2018, 37(12): 1255-1260.

肝癌是消化系统常见的恶性肿瘤,严重威胁人类健康。近年来对肿瘤转移机制的研究发现,肿瘤转移过程中有多个因素参与转移调控,是一个非常复杂的过程^[1]。肝癌细胞的侵袭和转移是肝癌治疗失败和患者致死的主要原因,了解肝癌的转移机制是十分关键而又迫切的需求。

在肿瘤侵袭转移过程中,肿瘤细胞侵犯并穿过基底膜及细胞外基质所组成的屏障,而蛋白酶(Cathepsin)在其中扮演了一个重要的角色^[2]。组织蛋白酶是具有降解正常细胞蛋白质功能的半胱氨酸蛋白酶,属于木瓜蛋白酶家族。目前在许多组织中鉴定出了超过12种不同的种类,其中组织蛋白酶B(Cathepsin B)尤为重要,它与肿瘤的侵袭和转移密切相关^[3-4]。研究表明,在许多侵袭性肿瘤或已经发生转移的肿瘤中,组织蛋白酶B是过量表达的,尤其在恶性肿瘤的细胞外基质(Extracellular Matrix, ECM)中更为明显^[5-7]。组织蛋白酶B可以与胱蛋白(cystatins)以及膜联蛋白四聚物(S100A10)相互作用,通过蛋白质水解激活ECM元件,进一步降解ECM,肿瘤细胞可以更好的移动并穿过细胞外基质和血管壁进入血液循环,从而在肿瘤侵袭转移中发挥重要作用^[3,8]。目前,越来越多的文献指出,组织蛋白酶B可能是肿瘤治疗的一个有效靶点^[3,9-11],对其作用网络的研究显得尤为重要。

酵母双杂交系统是在真核细胞中研究蛋白质-蛋白质相互作用的一种非常有效的技术。该系统采用的酵母转录因子是特殊设计的,其DNA结构域和DNA激活域是分离的,分别将其与诱饵蛋白和靶蛋白连接在一起,只有当诱饵蛋白与靶蛋白发生相互作用时,DNA结构域和DNA激活域发生空间接近,转录因子调控区下游的报告基因才能激活表达,因此根据报告基因是否表达,可以判断诱饵蛋白与靶蛋白之间是否存在相互作用。通过筛选特定的表达文库来寻找与靶蛋白相互作用的蛋白质,对于制作大规模蛋白质互作网络图而言,酵母双杂交技术也是一个有力的工具^[12]。在本研究中,我们采用人组织蛋白酶B作为诱饵蛋白,试图寻找其在肿瘤细胞中的直接相互作用蛋白。

1 材料与方法

1.1 质粒、载体和宿主菌

采用Clontech酵母双杂交系统。诱饵载体

pGBKT7:购自Clontech公司;诱饵基因pGBKT7-CTSB:作者所在实验室制备保存;靶载体pGADT7:购自Clontech公司;靶基因pGADT7-HepG2-cDNA文库:作者所在实验室自制;宿主菌AH109酿酒酵母:购自Clontech公司;DH5 α 感受态:作者所在实验室自制保存。

1.2 培养基

大肠杆菌培养基(LB):0.5 g/dL酵母提取物,1 g/dL多聚蛋白胨;1 g/dL NaCl,pH 7.0。

酵母完全培养基(YPDA):1 g/dL酵母提取物,2 g/dL蛋白胨,2 g/dL葡萄糖,0.02 g/dL腺嘌呤。

酵母缺陷型筛选培养基:参照Clontech公司的Yeast Protocols Handbook。

其中各种培养基分别以下列符号表示:SD-T:-trp;SD-TL:-trp,-leu;SD-TLH:-trp,-leu,-his;SD-TLHA:-trp,-leu,-his,-ade。

1.3 诱饵质粒构建及转化酵母菌株

CTSB扩增:以pMD18T-CTSB质料为模板,运用CTSB特异性引物对其进行PCR扩增(引物F:5'-AAGGCCATTACGCCATGTGGC AGCTCTGGG CCTCC-3';R:5'-CCGGCCGAGGCGGCCTTAGATCT TTTCCCAGTACTGATCGGTG-3')。PCR反应条件:首先94℃预变性3 min;其次94℃30 s,55℃30 s,72℃30 s,35个循环;最后72℃延伸10 min。

PCR产物回收并酶切:酶切体系为SfiI 1 μ L、10 $\times$ buffer 2 μ L、100 $\times$ BSA 0.2 μ L、PCR产物17 μ L,在50℃混合孵育5 h。

目的片段回收后与载体连接:T4连接反应体系为T4 1 μ L,T4 buffer 1 μ L,pGBKT7/SfiI 2 μ L,CTSB 5 μ L加水1 μ L至总体积为10 μ L,16℃连接过夜。

重组载体鉴定:重组载体转化大肠杆菌感受态DH5 α ,涂布于卡那霉素阳性平板,37℃过夜培养。挑取10个单克隆过夜培养后提取质粒,经酶切及测序鉴定,确定读码框序列是否正确。

1.4 诱饵蛋白自我转录激活检测

自我转录激活检测采用PEG/LiAC转化法,将诱饵质粒pGBKT7-CTSB转入AH109酵母菌株。设pGBKT7-p53/pGADT7-largeT为阳性对照,pGBKT7-laminC/pGADT7-largeT为阴性对照。HIS3和ADE2的检测采用点板培养的方法,将转化子点板至SD-TLHA平板,30℃恒温培养4 d,观察其生长状态,同时检测诱饵蛋白对LacZ报告基因是否

存在转录激活作用。如果转化诱饵质粒的酵母菌落在 SD-TLHA 平板上无法生长,同时也不会 LacZ 检测中使底物 X-Gal 变蓝,表明无自激活,否则存在自激活。

1.5 酵母双杂交文库筛选

用含有正确 pGBKT7-CTSB 诱饵质粒的 AH109 酵母转化子作为受体菌制备感受态,将文库质粒 pGADT7-HepG2-cDNA 转入其中,涂 SD-Trp-Leu-His + 5 mmol/L 3AT 平板。

文库 DNA 转化方法:从 SD-T 平板挑取含有 pGBKT7-CTSB 诱饵质粒的 AH109 酵母转化子单菌落一个,接种于液体 SD-T 培养基 50 mL,30 ℃、225 r/min 振荡培养 18 h。转接于 YPDA 液体 500 mL,使初始 OD₆₀₀ 为 0.2,30 ℃、225 r/min 振荡培养 4~5 h,至 OD₆₀₀ 为 0.6。离心收集菌体,室温下 4 000 r/min 离心 5 min。用 30 mL 无菌水重悬菌体,混匀,离心收集菌体,室温下 4 000 r/min 离心 5 min,弃上清液。用 20 mL 0.1 mol/L LiAc 重悬菌体,混匀,离心收集菌体,室温下 4 000 r/min 离心 5 min,弃上清液。用 10 mL 0.1 mol/L LiAc 重悬菌体,混匀,离心收菌,室温下 4 000 r/min 离心 5 min,弃上清液。向离心管中依次加入 9.6 mL 50% PEG3350,1.44 mL 1 mol/L LiAc,300 μL ssDNA (10 mg/mL),25 μg 文库质粒 DNA,用枪头吹打混匀,或剧烈振荡 1 min 左右,至完全混匀。30 ℃水浴孵育 30 min,42 ℃水浴热激 25 min,30 ℃水浴复苏 1 h。离心收菌,室温下 4 000 r/min 离心 5 min,弃上清液,用 10 mL 无菌水重悬菌体,尽量温和地混匀,从中取 20 μL 培养物经梯度稀释后涂 SD-TL 平板 3 块,用于检测文库转化效率。其余涂 SD-TLH + 5 mmol/L 3AT 平板,每块 200 μL,共 50 块。30 ℃恒温培养 3~4 d,观察转化结果,记录转化效率。根据效率平板的转化子数量,计算筛库效率。

为了消除背景生长菌落的干扰,在培养到第 3 天时,用绒布对筛库平板进行影印清除后,继续培养 7~14 d。分批挑取再次长出的转化子菌落进行下一步检测。至影印清除后继续培养 7 d,从筛库平板中挑取长出的阳性克隆单菌落,共挑取到 84 个初始阳性克隆转化子转接到 SD-TL 缺陷型平板中继续培养 2~3 d。将上述 SD-TL 缺陷型平板上长出的 84 个初始阳性克隆转化子分别用无菌水稀释后点种至 SD-TL 和 SD-TLHA 缺陷平板,30 ℃恒温培养

3~4 d 后观察结果。同时将 84 个初始阳性克隆用无菌水重悬后点于滤纸片上进行 LacZ 报告基因检测。

1.6 阳性克隆验证

对上述筛选的阳性克隆进行质粒提取,再次转化后进行抗性筛选和质粒抽提,然后分别与诱饵质粒共转酵母细胞 AH109 验证,再次阳性者提取质粒进行测序鉴定。

1.7 生物信息学分析

将测序得到的序列信息,采用 NCBI 数据库(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)对测序所得到的序列进行 BLAST 分析。

2 结果与讨论

2.1 诱饵质粒的构建

从上述每个连接体系转化平板上,随机挑取 4 个大肠杆菌转化子接种于带卡那抗性的液体 LB 培养基,于 37 ℃、250 r/min 振荡培养 16 h(过夜)后,用质粒引物进行 PCR 扩增,见图 1。对扩增得到阳性条带的克隆各选取两个(编号为 1、2)进行质粒抽提(Axygen 质粒小量抽提试剂盒)和测序,插入片段测序结果经比对确认正确。

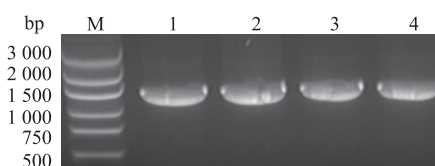


图 1 pGBKT7-CTSB 的 PCR 鉴定

Fig. 1 Identification of pGBKT7-CTSB using PCR method

2.2 诱饵蛋白自激活检测

对照菌株在 SD-TL 缺陷平板上都能正常生长,而仅有阳性对照可在 SD-TLHA 缺陷平板生长。pGBKT7-CTSB+pGADT7 转化子中随机挑选的 6 个菌落在 SD-TLHA 缺陷平板上不能生长,生长状态同阴性对照,LacZ 检测中结果也与阴性对照相同,因此不存在自激活。pGBKT7-CTSB 诱饵克隆没有自激活作用,可用于进行文库筛选,见图 2。

2.3 文库构建和筛选

使用一种独特的高质量的文库构建方法,以获得高质量的酵母双杂交文库。主要流程为:Trizol 法 RNA 的提取,mRNA 的分离,第一链 cDNA 的合成,全长 mRNA 的富集和第二链的合成,DSN 均一化处理,cDNA 长度分级,Gateway BP 重组和电转化,质

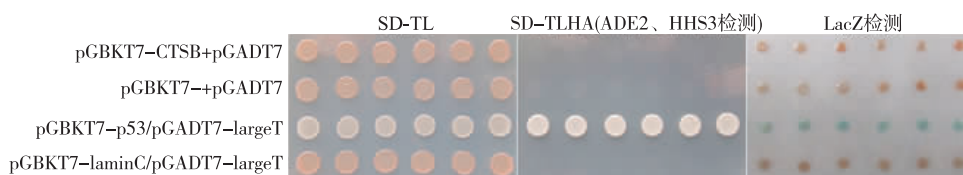


图 2 自激活检测结果

Fig. 2 Result of self-activation

粒提取, Gateway LR 重组到 pGADT7 载体和电转化, 酵母双杂交文库质粒提取, 就可以得到全长均一化的高质量酵母双杂交文库。

根据酵母转化效率平板的转化子数量, 计算筛库效率, 为 9.4×10^5 cfu/gDNA, 转库效率达标, 可以进行文库筛选, 见图 3。

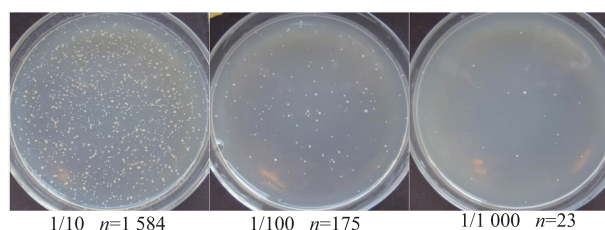
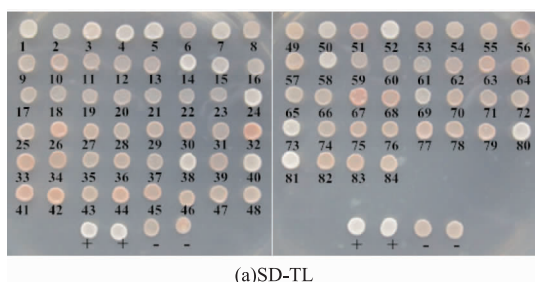


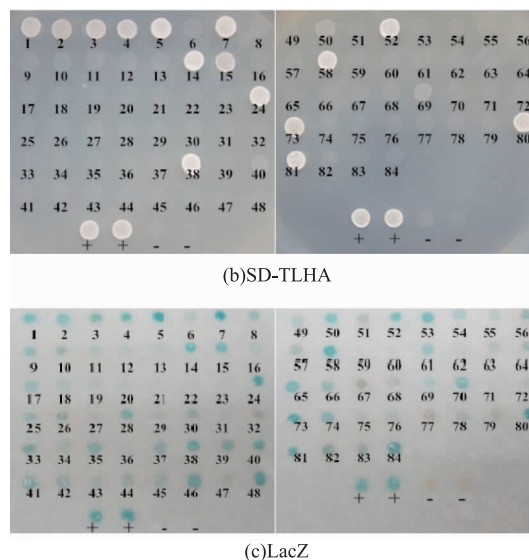
图 3 文库转化效率

Fig. 3 Efficiency of library transformation

然后从筛库平板上挑取 84 个单克隆, 进行 His、Ade 和 LacZ 报告基因实验进一步筛选, 因为只有能通过 3 个报告基因检测才可被判定与诱饵蛋白具有相互作用。在 ADE2 和 HIS3 报告基因的检测结果中, 可以看到, 阳性对照在 SD-TL 和 SD-TLHA 都能正常生长, 而阴性对照由于不会激活 ADE2 和 HIS3 报告基因, 在 SD-TL 可以正常生长, 但在缺少 His 和 Ade 这两种氨基酸的 SD-TLHA 平板上不能生长。因此, 在 84 个初始阳性克隆中, 能在 SD-TLHA 生长的是激活了 His 和 Ade 报告基因。本实验文库筛选得到的 84 个初始阳性克隆中共有 15 个能通过 3 个报告基因的检测, 编号分别为: 1、2、3、4、5、7、14、15、24、38、52、58、73、80、81, 见图 4。



(a)SD-TL



(c)LacZ

图 4 阳性克隆 His、Ade 和 LacZ 报告基因检测

Fig. 4 Report gene analysis of positive clone

将这些阳性克隆提取质粒并转入大肠杆菌 DH5a 中, 再次进行抗性筛选, 从中再次提取质粒而获得文库质粒。最终获得 15 个克隆, 质粒提取后进行测序分析。

2.4 生物信息学分析

将 15 个阳性克隆测序并 BLAST 分析, 在 GenBank 数据库中发现对应 7 个不同的基因, 编码 7 种已知的蛋白质, 分别是: BCL2-associated athanogene 6 (BAG6)、filamin A, alpha (FLNA)、ras homolog family member G (RHOG)、metallothionein 2A (MT2A)、ZKD family zinc finger C (ZKDC)、DEP domain containing 7 (DEPDC7) 和 A kinase (PRKA) interacting protein 1 (AKIP1)。

3 结 语

在本研究中, 我们发现 CTSB 可以和 7 个蛋白质发生直接结合, 其中包括 BAG6。BAG (Bcl-2 associated athanogene) 家族是细胞凋亡调控蛋白质家族, 是上世纪 90 年代初发现的。BAG 是多功能蛋

白质,能够和热激蛋白、信号分子、抗细胞凋亡蛋白 Bcl-2、核激素受体等多种细胞成分发生作用,BAG6 是 BAG 家族成员之一。BAG6 同样参与了大量生理和病理进程,包括凋亡、抗原呈递和 T 细胞相应等,而且可以调节新生多肽链的质量控制^[13]。此外,BAG6 和 Scythe、Bat3 一起作为 HSP70 的协同伴侣分子,共同参与多种生物学进程,包括细胞应激和活力等^[14]。通过 TRC 通路调节蛋白酶体的组装,BAG6 可以影响蛋白酶体的作用^[15]。BAG6 还可以清除错误定位的蛋白质^[16]。而 CTSB 与 BAG6 直接结合,可能是其发挥相应生物学功能的基础,有必要进一步研究其结合的方式以及具体参与了哪些进程。

细丝蛋白 A(filamin A,FLNA)是非肌性肌动蛋白结合蛋白,相对分子质量约 280 000,又名 ABP-280。能结合多种细胞膜蛋白及信号蛋白,可以调控细胞骨架的重排和细胞形态。FLNA 可以参与 RalA 诱导的丝状伪足^[17]及 Trio、PAK1 诱导的包膜边缘波动^[18-19]。FLNA 可以与微丝相互作用形成细胞骨架,为细胞提供机械强度,并支持细胞形态改变,因而能促进肿瘤的转移。FLNA 也可以通过其与小 GTPase 家族成员 R-Ras 作用促进细胞迁移^[20]。

RHOG(ras homolog family member G)是 Rho 蛋白质家族成员,通过与 GDP 结合或 GTP 结合来调节失活或激活状态,从而在信号级联中扮演分子开关的角色。Rho 家族蛋白可以驱动 actin 骨架重排调节,调控细胞形状、粘附和运动。敲除 RHOG 可以显著抑制恶性胶质瘤细胞的侵袭行为,而且抑制 Rac1 的激活^[21]。

人金属硫蛋白(Metallothionein,MT)相对分子质量约 6 000 000~7 000 000,在哺乳类动物中已发现四个 MT 组分:MT-1、MT-2、MT-3 及 MT-4。而 MT-2A 是 MT-Ⅱ亚型中惟一具有生物学作用的蛋白质^[22]。MT-2A 具有抗辐射、重金属解毒、清除自由基、修复组织损伤、调节微量元素平衡及抗衰老等作用,还与细胞的增殖、凋亡及肿瘤耐药密切相关,而且大量的研究发现,肿瘤组织中 MT-2A 的高表达与肿瘤的恶性程度及浸润深度呈正相关^[23]。

ZXDC 属于 ZXD 转录因子家族成员,可以调节 MHC 基因家族的转录^[24]。DEPDC7 作为 CARMA 的相互作用分子,对于激活 G 蛋白偶联受体后特异性传输 CBM 复合物信号是很关键的^[25]。此外,它还可以调节 NF- κ B 信号的激活^[25]。而 AKIP1 也可以调节 NF- κ B 信号通路^[26-27],进一步还可以调节肿瘤的血管生成^[28]。

研究发现,在侵袭性肿瘤中蛋白酶的活性会高表达,包括 CTSB^[29]。许多临床研究策略尝试采用抑制蛋白酶活性来控制蛋白酶介导的肿瘤细胞转移性渗透。考虑到 CTSB 对于肿瘤细胞的保护作用,目前针对 CTSB 的抑制剂进行了大量研究工作,发现抑制 CTSB 活性可以显著推迟肿瘤的生长^[30]。我们通过酵母双杂交技术发现了 CTSB 直接相互作用的蛋白质,这些蛋白质对于了解 CTSB 作用网络非常重要,有利于开发新型 CTSB 抑制剂。近年来从中药中筛选到许多高效的抗肿瘤单体化合物,包含了大量新型抑制剂,将是一个巨大的宝藏,等待人们去进一步挖掘^[31-32]。

参考文献:

- [1] FRIEDL P,ALEXANDER S. Cancer invasion and the microenvironment:plasticity and reciprocity [J]. *Cell*,2011,147(5): 992-1009.
- [2] TAN G J,PRNH Z K,LU J P,et al. Cathepsins mediate tumor metastasis[J]. *World J Biol Chem*,2013,4(4):91-101.
- [3] GONDI C S,RAO J S. Cathepsin B as a cancer target[J]. *Expert Opin Ther Targets*,2013,17(3):281-291.
- [4] BAO W,FAN Q,LUO X,et al. Silencing of Cathepsin B suppresses the proliferation and invasion of endometrial cancer[J]. *Oncol Rep*,2013,30(2):723-730.
- [5] GIROTTI M R,FERNANDEZ M,LOPEZ J A,et al. SPARC promotes cathepsin B-mediated melanoma invasiveness through a collagen I/alpha2beta1 integrin axis[J]. *J Invest Dermatol*,2011,131(12):2438-2447.
- [6] GOPINATHAN A,DENICOLA G M,FRESE K K,et al. Cathepsin B promotes the progression of pancreatic ductal adenocarcinoma in mice[J]. *Gut*,2012,61(6):877-884.
- [7] BECKHAM T H,LU P,CHENG J C,et al. Acid ceramidase-mediated production of sphingosine 1-phosphate promotes prostate

- cancer invasion through upregulation of cathepsin B[J]. **Int J Cancer**, 2012, 131(9):2034-2043.
- [8] MAI J, FINLEY R L, Jr., Waisman DM, Sloane BF. Human procathepsin B interacts with the annexin II tetramer on the surface of tumor cells[J]. **J Biol Chem**, 2000, 275(17):12806-12812.
- [9] HWANG J H, LEE S H, LEE K H, et al. Cathepsin B is a target of Hedgehog signaling in pancreatic cancer [J]. **Cancer Lett**, 2009, 273(2):266-272.
- [10] NAGARAJ N S, VIGNESWARAN N, ZACHARIAS W. Cathepsin B mediates TRAIL-induced apoptosis in oral cancer cells[J]. **J Cancer Res Clin Oncol**, 2006, 132(3):171-183.
- [11] CHAN A T, BABA Y, SHIMA K, et al. Cathepsin B expression and survival in colon cancer: implications for molecular detection of neoplasia[J]. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev**, 2010, 19(11):2777-2785.
- [12] MEHLA J, CAUFIELD J H, UUTZ P. The yeast two-hybrid system: a tool for mapping protein-protein interactions [J]. **Cold Spring Harb Protoc**, 2015, 15(5):425-430.
- [13] KAWAHARA H, MINAMI R, YOKOTA N. BAG6/BAT3: emerging roles in quality control for nascent polypeptides [J]. **J Biochem**, 2013, 153(2):147-160.
- [14] CORDUAN A, LECOMTE S, MARTIN C, et al. Sequential interplay between BAG6 and HSP70 upon heat shock [J]. **Cell Mol Life Sci**, 2009, 66(11-12):1998-2004.
- [15] AKAHANE T, SAHARA K, YASHIRODA H, et al. Involvement of Bag6 and the TRC pathway in proteasome assembly [J]. **Nat Commun**, 2013, 4(1):2234.
- [16] DAVID R. BAG6 'mops up' mislocalized proteins[J]. **Nat Rev Mol Cell Biol**, 2011, 12(9):550.
- [17] OHTA Y, SUZUKI N, NAKAMURA S, et al. The small GTPase RalA targets filamin to induce filopodia[J]. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 1999, 96(5):2122-2128.
- [18] VADLAMUDI R K, LI F, ADAM L, et al. Filamin is essential in actin cytoskeletal assembly mediated by p21-activated kinase 1 [J]. **Nature Cell Biology**, 2002, 4(9):681-690.
- [19] BELLANGER J M, ASTIER C, SARDET C, et al. The Rac1- and RhoG-specific GEF domain of Trio targets filamin to remodel cytoskeletal actin[J]. **Nat Cell Biol**, 2000, 2(12):888-892.
- [20] GAWECKA J E, GRIFFITHS G S, EK-RYLANDER B, et al. R-Ras Regulates Migration through an Interaction with Filamin A in Melanoma Cells[J]. **Plos One**, 2010, 5(6):e11269.
- [21] KWIATKOWSKA A, DIDIER S, FORTIN S, et al. The small GTPase RhoG mediates glioblastoma cell invasion [J]. **Mol Cancer**, 2012, 11:65.
- [22] COYLE P, PHILCOX J C, CAREY L C, et al. Metallothionein: the multipurpose protein[J]. **Cell Mol Life Sci**, 2002, 59(4):627-647.
- [23] CHERIAN M G, JAYASURYA A, BAY B H. Metallothioneins in human tumors and potential roles in carcinogenesis[J]. **Mutat Res**, 2003, 533(1-2):201-209.
- [24] RAMSEY J E, FONTES J D. The zinc finger transcription factor ZXDC activates CCL2 gene expression by opposing BCL6-mediated repression[J]. **Molecular Immunology**, 2013, 56(4):768-780.
- [25] D'ANDREA E L, FERRAVANTE A, SCUDIERO I, et al. The Dishevelled, EGL-10 and pleckstrin (DEP) domain-containing protein DEPDC7 binds to CARMA2 and CARMA3 proteins, and regulates NF-kappaB activation[J]. **PLoS One**, 2014, 9(12):e116062.
- [26] GAO N, HIBI Y, CUENO M, et al. A-kinase-interacting protein 1 (AKIP1) acts as a molecular determinant of PKA in NF-kappaB signaling[J]. **J Biol Chem**, 2010, 285(36):28097-28104.
- [27] GAO N, ASAMITSU K, HIBI Y, et al. AKIP1 enhances NF-kappaB-dependent gene expression by promoting the nuclear retention and phosphorylation of p65[J]. **J Biol Chem**, 2008, 283(12):7834-7843.
- [28] LIN C, SONG L, LIU A, et al. Overexpression of AKIP1 promotes angiogenesis and lymphangiogenesis in human esophageal squamous cell carcinoma[J]. **Oncogene**, 2015, 34(3):384-393.
- [29] MASON S D, JOYCE J A. Proteolytic networks in cancer[J]. **Trends Cell Biol**, 2011, 21(4):228-237.
- [30] SHREE T, OLSON O C, ELIE B T, et al. Macrophages and cathepsin proteases blunt chemotherapeutic response in breast cancer [J]. **Genes Dev**, 2011, 25(23):2465-2479.
- [31] JIANG Weizhe, ZHOU Yanwen, LI Jinshen. Comparison of total saponin contents in gynostemma cultivated of Guangxi[J]. **China Pharmaceuticals**, 2006, 15(3):26-27. (in Chinese)
- [32] LIU Xuexiang, CHEN Jianwei. Research progress of chinese medicine effective component biotransformation [J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2008, 27(2):14-18. (in Chinese)