

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2018.16.004

利用慢病毒介导的 shRNA 在 GT1-7 细胞中敲低 Srsf1 及其对 GnRH、Kiss1 的影响 *

陈 利 李 雨 李 凯 周宇荀 肖君华[△]

(东华大学化学化工与生物工程学院 上海 201620)

摘要 目的:探讨慢病毒介导短发夹 RNA(shRNA)敲低丝氨酸/精氨酸富集剪接因子 1(Srsf1)基因对小鼠 GT1-7 细胞中性发育相关基因促性腺激素释放激素(GnRH)、Kiss1 的影响。**方法:**实验分为 3 组,即空白对照组、阴性对照组及 shRNA 干扰组。用 Srsf1 shRNA 慢病毒稳转 GT1-7 细胞,Real-time PCR 和 Western blot 检测 GT1-7 细胞中 Srsf1 在 mRNA 和蛋白水平的变化,并检测稳转株中 GnRH、Kiss1 基因的表达情况。**结果:**慢病毒介导的 shRNA 成功感染了 GT1-7 细胞,与空白对照组及阴性对照组相比,shRNA 干扰组中 Srsf1 在 mRNA 水平降低了 45%($P<0.001$),在蛋白水平敲低了 42%($P<0.05$)。在稳定低表达 Srsf1 的 GT1-7 细胞中,GnRH、Kiss1 基因在 mRNA 水平也显著降低($P<0.05$)。**结论:**成功的构建了 Srsf1 基因敲低的细胞株。在 GT1-7 细胞中敲低 Srsf1 基因会抑制 GnRH、Kiss1 基因的表达。

关键词:精氨酸/丝氨酸富集的剪接因子 1;GT1-7;RNA 干扰

中图分类号:Q95-3;Q78;Q338 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2018)16-3017-05

Effect on GnRH, Kiss1 Gene with Lentivirus-shRNA Mediated Knock-down Srsf1 in GT1-7*

CHEN Li, LI Yu, LI Kai, ZHOU Yu-xun, XIAO Jun-hua[△]

(Institute of Chemical and Biological Engineering, Donghua University, Shanghai, 201620, China)

ABSTRACT Objective: Investigating the effect of lentivirus-mediated shRNA knock-down serine/arginine-rich splicing factor 1 (Srsf1) gene on gonadotropin-releasing hormone (GnRH), Kiss1 in the GT1-7 cell lines. **Methods:** In this experiment, control, negative control, and shRNA interference groups were designed. Stable cell clones were established by transfecting the lentivirus into the GT1-7 cells. Real-time PCR and Western blot were performed to detect the changes of the mRNA and protein levels of Srsf1. Meanwhile, the mRNA expression levels of GnRH and Kiss1 were also determined. **Results:** Lentiviral with Srsf1-shRNA was successfully infected into the GT1-7 cells. Compared to control and negative control groups, the mRNA expression level of Srsf1 was reduced by 45% ($P<0.001$) in shRNA interference group and the protein expression level was also decreased by 42% ($P<0.05$). In stable cell clones, GnRH and Kiss1 genes were also significantly reduced in mRNA levels ($P<0.01$). **Conclusion:** The stable cell clones were established successfully. It is confirmed that the mRNA expression levels of GnRH and Kiss1 decreased in GT1-7 cell lines with the Srsf1 knockdown.

Key words: Srsf1; GT1-7; RNA interference

Chinese Library Classification(CLC): R95-3; Q78; Q338 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2018)16-3017-05

前言

Serine/arginine splicing factor 1 (Srsf1, 也称为 ASF/SF2) 是高度保守的 SR(精氨酸、丝氨酸富集)家族的典型成员之一,本身是个剪接因子,参与 mRNA 的剪接^[1],同时也是一个转录后调控的蛋白,主要表现在维持染色质的稳定、促进转录、参与 mRNA 的成熟、帮助 mRNA 出核^[1-3],促进 mRNA 翻译^[4,5],促进蛋白泛素化降解等^[6]。除此之外,Srsf1 也参与无意义介导的 mRNA 降解(NMD)^[7]。Srsf1 对于大多数细胞来说都很重要,它可以维持基因组的稳定,细胞的活力,参与细胞周期的进程。最近的研究表明 Srsf1 也是一个原癌基因,在小肠、乳腺、大肠、

肝、肺癌等多种癌症中都发现了表达上调的 Srsf1 基因^[8,9]。虽然 Srsf1 功能众多,目前为止,没有研究表明它与性发育相关基因之间存在关系。

本次研究选取小鼠下丘脑神经元 GT1-7 为细胞模型,GT1-7 细胞能够稳定的分泌 GnRH,同时也表达 Kiss1 基因。下丘脑 GnRH 神经元以高频度、高幅度的脉冲形式释放 GnRH 是性发育起始的标志^[10,11],而 Kiss1 神经元分泌的 kisspeptin 则是 GnRH 释放的"脉冲发生器"^[12]。本课题组前期研究发现 Srsf1 是小鼠性发育相关基因 miR-505 的靶基因。为了了解 Srsf1 在 GT1-7 细胞中是否也影响了 GnRH、Kiss1 这两个性发育性相关基因,本文使用慢病毒载体构建了一个针对 Srsf1 基因的

* 基金项目:国家自然科学基金项目(31371257);上海市科委项目(15140900500,17140903100)

作者简介:陈利,硕士研究生,研究方向:生物化学与分子生物学;E-mail: chenli_5@163.com

[△] 通讯作者:肖君华,教授,研究方向:医学分子遗传学,E-mail: xiaojunhua@dhu.edu.cn

(收稿日期:2017-11-16 接受日期:2017-12-15)

shRNA,并转染 GT1-7 细胞形成稳定低表达 Srsf1 的 GT1-7 细胞株。并用实时荧光定量 PCR 技术检测稳转株中 GnRH、Kiss1 的表达情况。

1 材料与方法

1.1 材料

GT1-7 细胞系由本实验室保存,胎牛血清购自美国 Gibco 公司、PBS 缓冲液购自南京凯基生物科技发展有限公司、高糖培养基 DMEM 购自美国 Hyclone 公司、嘌呤霉素、过硫酸铵、SanPrep 柱式 PCR 产物纯化试剂盒购自上海生工生物工程有限公司、DH5 α 感受态细胞购自北京天根生化有限公司、RNAiso Plus 购自 Trakara 公司、逆转录试剂盒购 Thermo Scientific 公司、SuperReal PreMix SYBR Green 购自 TIANGEN 公司、SF2 抗体购自 Santa cruz 公司、RIPA lysis buffer 等蛋白相关试剂购自碧云天公司、引物合成于苏州泓迅生物科技有限公司、实时荧光定量 PCR 仪购自 Applied Biosystems 公司、Nanodrop 分光光度计购自 Thermo 公司,其余常用化学试剂均购自国药集团。

1.2 方法

1.2.1 Srsf1-shRNA 干扰慢病毒载体的构建、克隆和鉴定 根据 shRNA 设计的一般原则,筛选出 2 条针对小鼠 Srsf1 基因的特异性沉默位点 shRNA-1、shRNA-2;并设计一条非相关的阴性对照 NC,如表 1。将合成的好的 oligo 退火形成带粘性末端的双链片段,与带有 mCherry 荧光和嘌呤霉素抗性基因的载体 pLKD-CMV-R&PR-U6-shRNA 酶切连接,转化 DH5 α 感受态细胞,使用菌落 PCR 筛选出阳性克隆,并进行测序确认。

表 1 针对小鼠 Srsf1 基因设计的 shRNA 及阴性对照的序列

Table 1 Sequences of shRNAs targeting mouse Srsf1 and negative control shRNA

shRNA	gene	sequences
shRNA-1	Srsf1	GCCCAGAAGTCCAAGTTAT
shRNA-2	Srsf1	ACAGCAGGAGTCGCAGTTA
NC	NC	TTCTCCGAACGTGTCACGT

1.2.2 Srsf1-shRNA 慢病毒载体的包装 委托和元生物技术(上海)股份有限公司进行慢病毒包装,得到滴度如下的慢病毒:shRNA-1:4.42E+08 TU/mL;shRNA-2:2.92E+08 TU/mL;NC:4.46E+08 TU/mL。

1.2.3 Srsf1-shRNA 慢病毒转染 GT1-7 细胞 将 GT1-7 细胞用胰酶消化,铺到 24 孔板中,每孔 10 万个细胞。病毒按感染复数 (multiplicity of infection,MOI)1、10、50 的浓度分别感染 GT1-7 细胞。用含 10%FBS 的 DMEM 培养基在 37℃ 培养箱中培养 72 h,荧光显微镜下观察红色荧光的亮度,确定 MOI。

将 GT1-7 细胞分为三组接种到 24 孔板中(每孔 10 万个细胞),分别为实验组(感染 shRNA-1、shRNA-2),阴性对照组(感染 NC),空白对照组(未处理的 GT1-7 细胞)。用 MOI 为 50 的慢病毒转染 96 h 后,用嘌呤霉素(3 μ g/mL)进行筛选。经嘌呤霉素筛选 15 天后,少量细胞传到 6 孔板里,挑取单克隆到 96 孔板,扩大培养获取稳转株。收集细胞进行 Real-time PCR 和

western blot 的检测。

1.2.4 Real-time PCR 检测 Srsf1、GnRH、Kiss1 的 mRNA 表达水平 用 Trizol 法分别提取总细胞 RNA,使用 Nanodrop 分光光度计对 RNA 定量。取 1 μ gRNA 经过 Dnase I 处理后,用逆转录试剂盒逆转录成 cDNA,稀释 5 倍后作为荧光定量 PCR 的模板进行 Real-time PCR。内参基因 β -actin 和 Srsf1 的引物序列见表 2。结果采用 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 的方法进行分析。实验至少重复三次。

表 2 Real-time PCR 引物序列
Table 2 Primers used for Real-time PCR

gene	sequences(5'→3')
β -actin-F	GCA TGGGTCAGAAGGATTCC
β -actin-R	TGCTCGATGGGGTACTTCAG
Srsf1-F	GGA AGC TGG CAG GAC TTA AA
Srsf1-R	CGG TAA ACA TCA GCG TAA CAT
GnRH-F	CCACTGGCCCGTTTAC
GnRH-R	GCTTCCTCTTCAATCAGATTTCC
Kiss1-F	GGCACCTGGATAAAGTGAAG
Kiss1-R	GATTCCTTTTCCAGGCATT

1.2.5 Western blot 检测 Srsf1 的蛋白表达水平 将细胞铺进 6 孔板,汇合度达到 90%以上时收集细胞,用 RIPA 裂解液裂解细胞,离心收集上清,用 BCA 方法检测蛋白浓度。加入 loading buffer 99℃煮 5-10 min,取 30 μ g 跑 SDS-PAGE,转膜后,用 5%BSA 封闭 1 h,孵一抗(1:1000)4℃过夜。第二天,室温孵育辣根过氧化物酶标记的二抗 (1:1000)1 h,TBST 洗膜 (3 $\times$ 15 min),用碧云天的 ECL Plus 试剂避光处理 1-2 min 后放入 Bio-Rad 凝胶成像系统中进行拍照,图片用 Image Lab 软件进行分析,后用 Adobe Illustrator 软件进行作图。

1.3 统计学方法与作图

实验结果采用 GraphPad Prism 和 Image Lab 软件进行统计分析,采用 GraphPad Prism 和 Adobe Illustrator 作图。各组间比较采用 t-检验, $P<0.05$ 表示有统计学差异。

2 结果

2.1 GT1-7 细胞转染慢病毒的最适 MOI

各组慢病毒浓度按 MOI 为 1、10、50 的量转染 GT1-7 细胞,转染后 72 h 在荧光显微镜下观察细胞 mCherry 荧光的亮度,见图 1。确定 1:50 的稀释倍数是后续实验使用慢病毒的 MOI。

2.2 Real-time PCR 检测 Srsf1 的表达

Real-time PCR 检测 Srsf1 的表达水平如图 2 所示,空白对照组 GT1-7 细胞中 Srsf1 的表达量与阴性对照组 NC 相比无明显差异($P=0.7072$),实验组 shRNA-1 和 shRNA-2 中 SRSF1 的表达量相比 GT1-7 显著降低($P<0.05$)。其中 shRNA-1 的敲低效率达到 45%($P<0.001$),shRNA-2 的敲低效率为 32%($P<0.01$)。后续实验选取 shRNA-1 这株细胞进行。

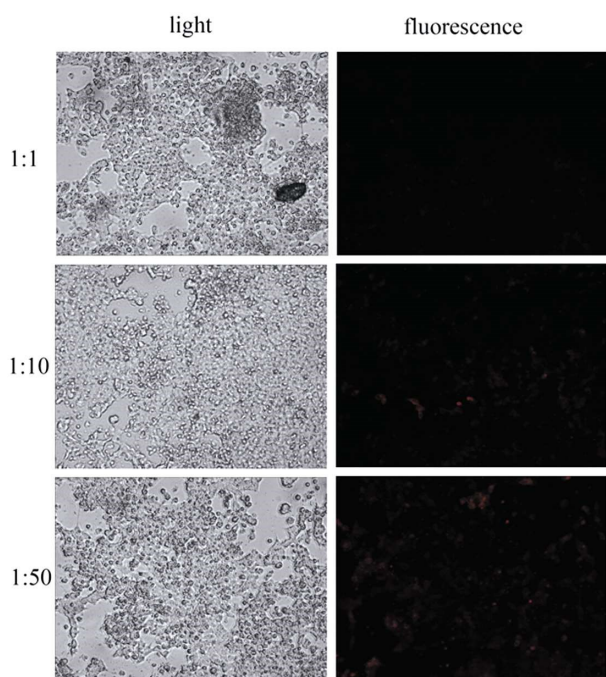


图1 荧光显微镜观察 mCherry 的表达(白光和荧光视野× 100)

Fig.1 Expression of mCherry detected by fluorescence microscope (light and fluorescence field× 100)

2.3 Western blot 检测 Srsf1 敲低的 GT1-7 细胞中 SRSF1 蛋白的表达

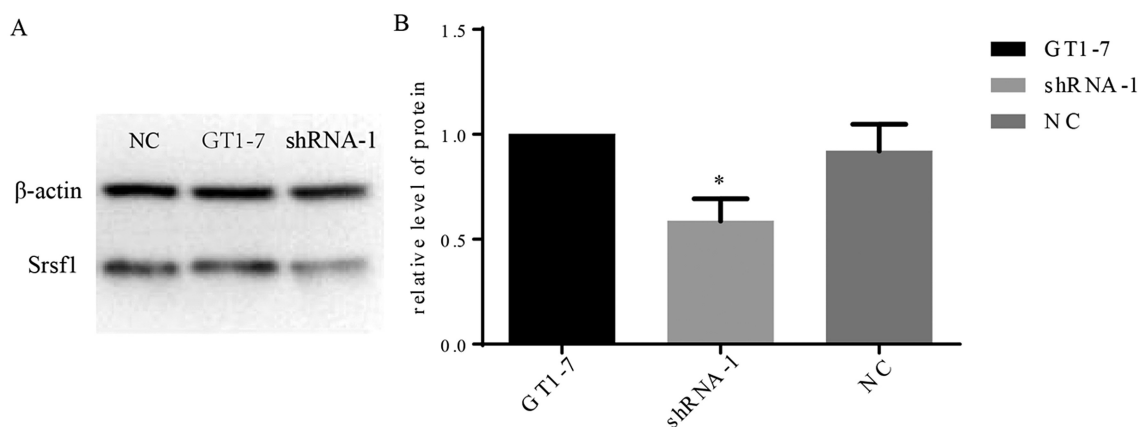


图3 慢病毒干扰的 GT1-7 细胞中 Srsf1 蛋白的表达

Fig.3 Protein expression of Srsf1 in GT1-7 cells with lentivirus infection

Note: Bars are means and vertical bars represent SEM (* $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$).

Figure in column A is western blot results of NC and GT1-7 and shRNA, figure in column B show relative level of protein.

3 讨论

Srsf1 本身是个剪接因子, 参与 mRNA 初级体的剪接, 在 mRNA 代谢方面也发挥重要作用, 在核内可以与 RNA 聚合酶 II 作用促进转录延伸^[2], 也可以与 TAP/NXF1 受体相互作用帮助成熟 mRNA 进行核输出^[13], 并且在维持基因稳定性中也发挥重要作用, 可以阻止诱变型 R 环结构的生成^[14]。在细胞质中可以直接或间接的和 mTORC 复合体相互作用来增强翻译^[5], Srsf1 还通过 RRM2 结构域与 SUMO E3 连接酶 PIAS1 相互作用, 调节蛋白泛素化^[15]。除此之外, Srsf1 还是一个原癌基因和肿

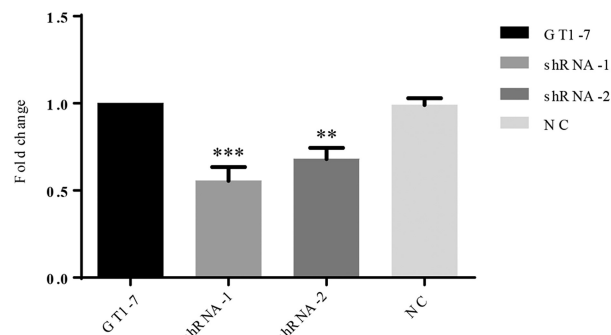


图2 Srsf1-shRNA 慢病毒稳转 GT1-7 细胞后 Srsf1 的表达

Fig.2 mRNA expression of Srsf1 in GT1-7 cells infected with Srsf1-shRNA lentivirus

Note: Bars are means and vertical bars represent SEM (* $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$).

Western blot 结果如图 3 所示, 空白对照组 GT1-7 中 Srsf1 蛋白表达量与阴性对照相比无明显差异 ($P>0.05$)。实验组 shRNA-1 与 GT1-7 相比 Srsf1 蛋白表达量降低了 42% ($P<0.05$)。

2.4 Srsf1 敲低的 GT1-7 细胞中 GnRH、Kiss1 的表达

检测敲低 Srsf1 的 GT1-7 细胞中性发育相关基因 GnRH、Kiss1 的表达变化, 结果如图 4 所示。在 Srsf1-shRNA 干扰实验组中, GnRH、Kiss1 的表达量相比于 GT1-7 显著降低 ($P<0.05$), GnRH 降低 35% ($P<0.01$), Kiss1 下降 46% ($P<0.001$)。

瘤密切相关^[16], 有研究表明 Srsf1 的上调会促进成纤维细胞和上皮细胞的增殖, 抑制它们的凋亡, 从而使细胞获得更强的增殖能力和凋亡抗性^[17]。在结肠直肠癌 (CRC) 细胞中, 长非编码 RNA metastasis associated lung adenocarcinoma transcript 1 (MALAT1) 能够促进 SRPK1 催化 SRSF1 磷酸化, 导致 AKAP-9 (A-kinase anchor protein 9) 表达上调, 增强 CRC 细胞扩增、侵袭和转移的能力^[18]。已知一些和性发育相关的基因同时也是肿瘤相关基因, Kiss1 基因就可以抑制许多癌细胞的转移能力^[19]。本次研究为了探索 GT1-7 中 Srsf1 对性发育相关基因的影响, 在 GT1-7 细胞中用慢病毒介导 shRNA 的方法敲低

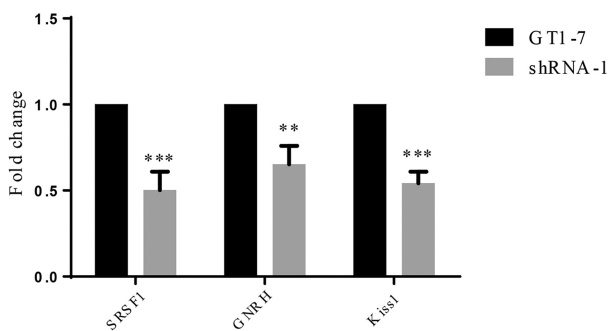


图4 Srsf1 敲低的 GT1-7 细胞中 GnRH、Kiss1 的表达量变化

Fig.4 Change of GnRH and Kiss1 mRNA expression in GT1-7 cells with Srsf1 knockdown

Note: Bars are means and vertical bars represent SEM

(* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$)

Srsf1,并检测性发育相关基因的表达量。RNA 干扰(RNAi)可以引起目标基因的特异性沉默,广泛的应用于基因功能研究。近来,一系列技术的进步加强了病毒性传递的 RNAi 性能,例如,把短发卡 RNA (shRNA) 合并入内源性的 microRNA (shRNAmiRs),使用 Tet 调控的启动子同步起始基因敲除^[20]。使用慢病毒载体,可使 shRNA 片段高效的转染细胞,并整合到宿主的基因组中进行持续的基因敲除^[21]。本实验利用慢病毒包装的 shRNA,成功的感染了 GT1-7 细胞,并使 Srsf1 的 shRNA 整合到基因组中,持续的对细胞内的 Srsf1 进行敲减。

在 GT1-7 细胞中敲低 Srsf1 会抑制性发育相关基因 GnRH、Kiss1 的表达,这是一个非常重要的结果,首次把剪接因子 Srsf1 蛋白与性发育相关基因联系到了一起。GnRH 是由下丘脑 GnRH 神经元分泌的,GnRH 分泌调控是深入揭示性发育启动的关键因素。Kisspeptin 是 Kiss1 基因编码的神经内分泌肽类激素,可直接作用于下丘脑 GnRH 神经元,促进 GnRH 分泌,激活 HPG 轴,启动性发育^[22]。虽然在本次研究中看到了 Srsf1 影响了 GT1-7 细胞中 GnRH、Kiss1 基因的表达,但其中的分子机制还是未知的。已有证据表明 Srsf1 可以激活丝裂原活化蛋白激酶(MAPK),与腺苷酸活化蛋白激酶(AMPK)也相关^[23,24],而在 GT1-7 细胞中,AMPK 通过接受上游信号调控活力来影响 GnRH 分泌^[25]。Kisspeptin 能够刺激 MAPK-AKT 信号,与 ERK 信号在功能上参与 GnRH mRNA 表达^[26]。为了明确 Srsf1 调控性发育相关基因的分子机制,还需要做很多工作来完成。后续可以在 SRSF1 敲低的细胞株中进行 RNA-seq,找到 SRSF1 敲低影响的信号通路,同时进行 RNA 免疫共沉淀测序,找到在 GT1-7 细胞中 SRSF1 和哪些 mRNA 相互作用,结合文献的阅读及实验验证,来解析其中的分子机制。

本次实验在低表达 Srsf1 的 GT1-7 细胞中看到 GnRH、Kiss1 基因表达量的减少,这提示了 Srsf1 和性发育之间有某种联系。但是在 GT1-7 中 Srsf1 的敲低效率只有不到 50%,可能因为 Srsf1 是一个极其重要的基因,如果敲低的程度比较高的话,会导致细胞的死亡。有报道称在和小鼠和秀丽隐杆线虫中发现敲除 Srsf1,会造成胚胎致死^[1]。在非洲爪蟾胚胎发育研究中发现,Srsf1 通过调节组织特定基因的可变剪接,影响心脏、软骨和胚层的形态发育^[27]。而且当 Srsf1 过表达的时候,会增强细胞

的增殖、侵袭、转移和抗凋亡能力,引起肿瘤的发生。细胞为了抵御 Srsf1 这种异常表达带来的伤害,会很严格的调控细胞内 Srsf1 基因的表达。Srsf1 有一个自身的调控作用,当细胞内 Srsf1 浓度较高的时候,会引起 Srsf1mRNA 产生无意义介导的降解^[28],而在 Srsf1 浓度较低时又会促进自身 mRNA 的转录和翻译。Srsf1 还可以和 miR-7 相互作用形成一个负反馈环路,Srsf1 能够作为辅助因子结合 pri-miRNA 促进 miR-7 的 Drosha 切割,当细胞中出现过多的 miR-7 时,miR-7 便会与 Srsf1 的 3'UTR 作用抑制 mRNA 的翻译^[29]。所以作者推测在 GT1-7 细胞中 Srsf1 即使被 shRNA 敲低,也会维持在一定的水平。

综上所述本实验成功的构建了稳定低表达 Srsf1 的细胞株,并发现在 GT1-7 细胞中敲低 Srsf1 会抑制性发育相关基因 GnRH、Kiss1 的表达。为后期解析 SRSF1 影响性发育相关基因的分子机制提供研究基础。

参考文献(References)

- [1] Das S, Krainer AR. Emerging functions of SRSF1, splicing factor and oncoprotein in RNA metabolism and cancer [J]. Mol Cancer Res, 2014, 12: 195-1204
- [2] Long JC, Caceres JF. The SR protein family of splicing factors: master regulators of gene expression[J]. Biochem J, 2009, 417: 15-27
- [3] Zhong XY, Wang P, Han J, et al. SR proteins in vertical integration of gene expression from transcription to RNA processing to translation [J]. Mol. Cell, 2009, 35: 1-10
- [4] Hautbergue GM, Castelli LM, Ferraiuolo L, et al. SRSF1-dependent nuclear export inhibition of C9ORF72 repeat transcripts prevents neurodegeneration and associated motor deficits [J]. Nat Commun, 2017, 8: 16063
- [5] Ben HV, Denichenko P, Siegfried Z, et al. S6K1 alternative splicing modulates its oncogenic activity and regulates mTORC1[J]. Cell Rep, 2013, 3: 103-115
- [6] Aubol BE, Plocnik RM, Hagopian JC, et al. Partitioning RS domain phosphorylation in an SR protein through the CLK and SRPK protein kinases[J]. Journal of Molecular Biology, 2013, 425(16): 2894-2909
- [7] Feng D, Su RC, Zou L. Increase of a group of PTC (+) transcripts by curcumin through inhibition of the NMD pathway [J]. Biochim Biophys Acta, 2015, 1849(8): 1104-1115
- [8] Anczuków O, Rosenberg AZ, Akerman M, et al. The splicing-factor SRSF1 regulates apoptosis and proliferation to promote mammary epithelial cell transformation[J]. Nat Struct Mol Biol, 2012, 19: 220-228
- [9] Karni R, de Stanchina E, Lowe SW, et al. The gene encoding the splicing factor SF2/ASF is a protooncogene [J]. Nat Struct Mol Biol, 2007, 14: 185-193
- [10] Ojeda S, Lomniczi A. Puberty in 2013: unravelling the mystery of puberty[J]. Nat Rev Endocrinol, 2014, 10 (2): 67-69
- [11] Ezzat A, Pereira A, Clarke IJ. Kisspeptin is a Component of the Pulse Generator for GnRH Secretion in Female Sheep but not the Pulse Generator[J]. Endocrinology, 2015, 156: 1828-1837
- [12] Kanasaki H, Oride A, Mijidodj T, et al. How is GnRH regulated in GnRH-producing neurons? Studies using GT1-7 cells as a GnRH-producing cell model [J]. Gen Comp Endocrinol, 2017, 247: 138-142
- [13] Zhou H, Bulek K, Li X. IRAK2 directs stimulus-dependent nuclear

- export of inflammatory mRNAs[J]. *Elife*, 2017
- [14] Loomis R J, Naoe Y, Parker J B, et al. Chromatin binding of SRp20 and ASF/SF2 and dissociation from mitotic chromosomes is modulated by histone H3 serine 10 phosphorylation [J]. *Molecular Cell*, 2009, 33(4): 450
- [15] Pozzi B, Bragado L, Will CL, et al. SUMO conjugation to spliceosomal proteins is required for efficient pre-mRNA splicing[J]. *Nucleic Acids Res*, 2017, 45(11): 6729-6745
- [16] Kędzierska H, Piekiełko WA. Splicing factors of SR and hnRNP families as regulators of apoptosis in cancer [J]. *Cancer Lett*, 2017, 396: 53-65
- [17] Das S, Anczuków O, Akerman M, et al. Oncogenic splicing factor SRSF1 is a critical transcriptional target of MYC [J]. *Cell Rep*, 2012, 1: 110-117
- [18] Hu ZY, Wang XY, Guo W, et al. Long non-coding RNA MALAT1 increases AKAP-9 expression by promoting SRPK1-catalyzed SRSF1 phosphorylation in colorectal cancer cells[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(10): 11733
- [19] Tian J, Al-Odaini AA, Wang Y, et al. KiSS1 gene as a novel mediator of TGF β -mediated cell invasion in triple negative breast cancer[J]. *Cell Signal*, 2017, 42: 1-10
- [20] Adams F, Heckl D, Hoffmann T, et al. An optimized lentiviral vector system for conditional RNAi and efficient cloning of microRNA embedded short hairpin RNA libraries [J]. *Biomaterials*, 2017, 139: 102-115
- [21] Liu L, Zhang N, Liu J, et al. Lentivirus-mediated siRNA interference targeting SGO-1 inhibits human NSCLC cell growth[J]. *Tumour Biol*, 2012, 33(2): 515-521
- [22] Ezzat A, Pereira A, Clarke IJ. Kisspeptin is a Component of the Pulse Generator for GnRH Secretion in Female Sheep but not the Pulse Generator[J]. *Endocrinology*, 2015, 156: 1828-1837
- [23] Finley J. Alteration of splice site selection in the LMNA gene and inhibition of progerin production via AMPK activation [J]. *Med Hypotheses*, 2014, 83(5): 580-587
- [24] Shimoni SA, Lebenthal LI, Zender L, et al. RRM1 domain of the splicing oncoprotein SRSF1 is required for MEK1-MAPK-ERK activation and cellular transformation [J]. *Carcinogenesis*, 2013, 34(11): 2498-2504
- [25] Terasaka T, Otsuka F, Tsukamoto N, et al. Mutual interaction of kisspeptin, estrogen and bone morphogenetic protein-4 activity in GnRH regulation by GT1-7 cells [J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2013, 381(1-2): 8-15
- [26] Damm E, Buech TR, Gudermann T, et al. Melanocortin-induced PKA Activation Inhibits AMPK activity via ERK-1/2 and LKB-1 in hypothalamic GT1-7 cells[J]. *Mol Endocrinol*, 2012, 26(4): 643-654
- [27] Lee SH, Lee HK, Kim C, et al. The splicing factor SRSF1 modulates pattern formation by inhibiting transcription of tissue specific genes during embryogenesis [J]. *Biochemical & Biophysical Research Communications*, 2016, 477(4): 1011-1016
- [28] Feng D, Su RC, Zou L. Increase of a group of PTC (+) transcripts by curcumin through inhibition of the NMD pathway [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2015, 1849(8): 1104-1115
- [29] Gonçalves V, Jordan P. Posttranscriptional Regulation of Splicing Factor SRSF1 and Its Role in Cancer Cell Biology [J]. *Biomed Res Int*, 2015, 2015: 287048

(上接第 3016 页)

- [12] Hirota Y, Yamashita S, Kurihara Y, et al. Mitophagy is primarily due to alternative autophagy and requires the MAPK1 and MAPK14 signaling pathways[J]. *Autophagy*, 2015, 11(2): 332-343
- [13] Shang YY, Yao M, Zhou ZW, et al. Alisertib promotes apoptosis and autophagy in melanoma through p38 MAPK-mediated aurora a signaling[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(63): 107076-107088
- [14] Zhang L, Zhang J, Shea K, et al. Autophagy in pancreatic acinar cells in caerulein-treated mice: immunolocalization of related proteins and their potential as markers of pancreatitis [J]. *Toxicol Pathol*, 2014, 42(2): 435-457
- [15] Glover K, Li Y, Mukhopadhyay S, et al. Structural transitions in conserved, ordered Beclin 1 domains essential to regulating autophagy[J]. *J Biol Chem*, 2017, 292(39): 16235-16248
- [16] Furuta K, Yang XL, Chen JS, et al. Differential expression of the lysosome-associated membrane proteins in normal human tissues[J]. *Arch Biochem Biophys*, 1999, 365(1): 75-82
- [17] Zhu H, Yu X, Zhu S, et al. The fusion of autophagosome with lysosome is impaired in L-arginine-induced acute pancreatitis[J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2015, 8(9): 11164-11170
- [18] Gukovskaya AS, Gukovsky I. Autophagy and pancreatitis [J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2012, 303(9): G993-993G1003
- [19] Gukovsky I, Li N, Todoric J, et al. Inflammation, autophagy, and obesity: common features in the pathogenesis of pancreatitis and pancreatic cancer[J]. *Gastroenterology*, 2013, 144(6): 1199-1209.e4
- [20] Bednarczyk M, Muc-Wierzoń M, Waniczek D, et al. Autophagy-related gene expression in colorectal cancer patients [J]. *J Biol Regul Homeost Agents*, 2017, 31(4): 923-927
- [21] Shen JD, Cai QF, Yan LJ, et al. Cathepsin L is an immune-related protein in Pacific abalone (*Haliotis discus hannai*)--Purification and characterization. *Fish Shellfish Immunol*, 2015, 47(2): 986-995
- [22] Hu X, Hu X, Hu B, et al. Molecular cloning and characterization of cathepsin L from freshwater mussel, *Cristaria plicata*. *Fish Shellfish Immunol*, 2014, 40(2): 446-454
- [23] Mehanna S, Suzuki C, Shibata M, et al. Cathepsin D in pancreatic acinar cells is implicated in cathepsin B and L degradation, but not in autophagic activity[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2016, 469(3): 405-411
- [24] Wartmann T, Mayerle J, K?hne T, et al. Cathepsin L inactivates human trypsinogen, whereas cathepsin L-deletion reduces the severity of pancreatitis in mice[J]. *Gastroenterology*, 2010, 138(2): 726-737
- [25] Zhu H, Yu X, Zhu S, et al. The fusion of autophagosome with lysosome is impaired in L-arginine-induced acute pancreatitis[J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2015, 8(9): 11164-11170