

• 论 著 •

α-toxin 调控 miR-142 表达抑制巨噬细胞吞噬功能的机制研究*

冉 磊, 李元朝, 张斌, 何 威, 王儒鹏[△]

(第三军医大学新桥医院皮肤风湿免疫科, 重庆 400038)

摘 要:目的 探讨金黄色葡萄球菌(简称金葡菌)分泌的 α-外毒素(Hla)调控 miR-142 表达并抑制巨噬细胞吞噬功能的分子机制。方法 采用野生型金葡菌菌株(WT *S. aureus*)、Hla 缺失金葡菌菌株(Δ HlaS. *aureus*)及磷酸盐缓冲液(PBS)感染 BALB/C 小鼠背部皮肤、RAW264.7 鼠源巨噬细胞,检测感染后皮肤组织和巨噬细胞 miR-142 表达水平。构建荧光素酶报告基因载体,采用荧光素酶活性实验分析 miR-142 对蛋白激酶 Cα(PKCα)表达水平的调控作用。在 RAW264.7 细胞中过表达 miR-142 模拟物,分析细胞吞噬能力。结果 与 PBS 处理组相比, Δ HlaS. *aureus* 与 WT *S. aureus* 处理组皮肤组织和巨噬细胞 miR-142 表达水平下降($P<0.05$)。MiR-142 模拟物可抑制荧光素酶活性,抑制巨噬细胞 RAW264.7 细胞的吞噬能力($P<0.05$)。结论 金葡菌分泌的 Hla 促进巨噬细胞表达 miR-142,进而通过下调 PKCα 表达水平抑制巨噬细胞的吞噬功能。

关键词:金黄色葡萄球菌; α-外毒素; miR-142; 巨噬细胞

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2017.11.001

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2017)11-1441-04

Staphylococcus aureus α-toxin regulate miR-142 expression and inhibit macrophage phagocytosis*

RAN Lei, LI Yuanchao, ZHANG Bin, HE Wei, WANG Rupeng[△]

(Department of Dermatology and Rheumatology, Xinqiao Hospital, the Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: **Objective** To explore the mechanism that *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) α-toxin(Hla) regulate miR-142 expression and inhibit macrophage phagocytosis. **Methods** BALB/C mice and RAW264.7 cells were infected with wild type *S. aureus* (WT *S. aureus*), Hla deletion *S. aureus* (Δ HlaS. *aureus*) or phosphate buffered saline(PBS), and the expression level of miR-142 of skin tissues and cells were detected. miR-142 mimics and inhibitor were then applied in the RAW264.7 culture to examine the effect on phagocytosis. Direct targeting of miR-142 on protein kinase Cα(PKCα) was assessed by luciferase assay and western blotting. **Results** miR-142 expression in Δ HlaS. *aureus* group were significantly down-regulated than WT *S. aureus* group($P<0.05$). MiR-142 mimics inhibited RAW264.7 phagocytosis ability and inhibitor enhanced RAW264.7 phagocytosis ability. PKCα was directly targeted by miR-142. MiR-142 mimics significantly decreased the mRNA expression levels of PKCα in RAW264.7 cells($P<0.05$). **Conclusion** Hla could promote miR-142 expression in macrophages. MiR-142 could inhibit macrophage phagocytosis through down-regulated PKCα.

Key words: *Staphylococcus aureus*; α-toxin; miR-142; macrophage

金黄色葡萄球菌(简称金葡菌)是人体皮肤定植菌之一,与皮肤感染和皮肤炎性疾病相关^[1]。金葡菌通过表达、分泌毒素及免疫调节分子,逃逸机体的免疫杀伤和免疫清除^[2]。α-外毒素(Hla)是金葡菌外分泌的重要毒素,也是其最主要的致病因子,与金葡菌感染所致炎性损伤及皮肤屏障功能损伤密切相关^[3]。巨噬细胞是抵抗金葡菌感染的重要的天然免疫细胞,能够吞噬金葡菌,激活抗菌功能,降解、递呈抗原,激活适应性免疫应答,最终杀灭吞噬的金葡菌。动物实验证实,Hla 缺失突变金葡菌毒力、致病性减弱,但 Hla 是否通过抑制巨噬细胞的吞噬能力而增强金葡菌在的定植力及相关机制并不清楚^[4]。微小 RNA(miRNAs)是一类重要的非编码 RNAs,参与多种生物信号通路,包括细胞分化、凋亡及免疫^[5]。miR-146a 和 miR-155 对巨噬细胞和树突状细胞等多种免疫细胞的功能具有调节作用^[6]。miR-24、miR-30b、miR-142 则与巨噬细胞的吞噬功能和细胞因子分泌相关^[7]。Hla 是否通过调控 miRNAs 表达水平影响巨噬细胞吞噬能力尚不明确。为此,本研究对 Hla 相关作用机制进行了分析。现将研究结果报道如下。

1 材料与方法

1.1 试剂与动物 野生型金葡菌菌株 8325-4(WT *S. aureus*) 购自美国典型培养物保藏中心(ATCC),Hla 缺失金葡菌菌株

(Δ HlaS. *aureus*)由都柏林大学 Foster 教授馈赠。鼠源巨噬细胞株 RAW264.7 及 HEK293 细胞购自上海细胞研究所。金葡菌固体培养基(TSA),液体培养基(TSB)购自奥博星公司。RNA 提取试剂和定量聚合酶链反应(qRT-PCR)试剂盒购自日本 TaKaRa 公司。miR-142 逆转录引物、扩增上游引物和扩增下游引物购自于广州锐博公司。野生型及突变型蛋白激酶 Cα(PKCα)3'非翻译区 UTR(3'UTR)寡核苷酸(PKCα3'UTR WT 及 Mutant PKCα3'UTR)购自上海英骏公司。PKCα、3-磷酸甘油醛脱氢酶(GAPDH)一抗购自美国 Abcam 公司。6~8 周龄无特定病原体(SPF)级雌性 BALB/C 小鼠购自第三军医大学实验动物中心。本研究动物实验遵循 3R 原则,经第三军医大学实验动物伦理委员会审核批准。

1.2 方法

1.2.1 金葡菌皮肤感染模型建立 对 BALB/C 小鼠进行编号,随机分为磷酸盐缓冲液(PBS)对照组、WT *S. aureus* 感染组和 Δ HlaS. *aureus* 感染组,每组 6 只。各组小鼠均背部脱毛,并进行相应处理。PBS 对照组处理方法为皮内注射 100 μL 无菌 PBS。WT *S. aureus* 感染组处理方法为皮内注射 100

* 基金项目:国家自然科学基金项目(81271767)。

作者简介:冉磊,男,主治医师,主要从事特应性皮炎、皮肤感染与免疫研究。△ 通信作者,E-mail:wrp71@163.com。

μL 浓度为 2×10^7 CFU 的 WT *S. aureus* 菌液。 $\Delta\text{HlaS. aureus}$ 感染组处理方法为皮内注射 $100 \mu\text{L}$ 浓度为 2×10^7 CFU 的 $\Delta\text{HlaS. aureus}$ 菌液。

1.2.2 细胞培养 采用含 10% 胎牛血清(FBS)的完全 Hyclone 培养液, 37°C 、5% CO_2 条件下培养 RAW264.7 和 HEK293 细胞。

1.2.3 RAW264.7 细胞体外感染 调整 RAW264.7 细胞浓度至 $5 \times 10^5/\text{mL}$, WT *S. aureus*、 $\Delta\text{HlaS. aureus}$ 感染菌量与 RAW264.7 细胞的比例, 即感染复数(MOI)为 5 : 1; 培养 6 h 后, 收集 RAW264.7 细胞进行相关检测。

1.2.4 qRT-PCR 检测 常规方法提取细胞总 RNA。按 miRNAs 逆转录试剂盒说明书要求, 加入所需试剂, 包括 $1 \mu\text{g}$ 总 RNA, $2 \mu\text{L}$ 浓度为 $5 \mu\text{mol/L}$ 的 miR-142 逆转录引物, 反应条件为 42°C 15 min、 85°C 15 s。按 qRT-PCR 试剂盒说明要求, 加入 cDNA、预混液(premix)、miR-142 上游引物、miR-142 下游引物, 反应条件为 95°C 3 min, 95°C 15 s, 58°C 20 s 循环 40 次。采用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 方法定量分析 miR-142 在各组皮肤组织和巨噬细胞中的表达水平。

1.2.5 RAW264.7 细胞吞噬能力测定 按每孔 4.0×10^5 个细胞向 96 孔板中加入 RAW264.7 细胞, 分为 3 组处理, 即对照模拟物(control mimics)组、miR-142 模拟物(mimics)组、抑制剂(inhibitor)组, 分别转染 control mimics、miR-142 mimics 和 inhibitor, 24 h 后加入 pHrodo Red 标记的金葡菌(购自美国 Life Technologies 公司), 孵育 1 h 后, 以 PBS 洗涤 3 次; 加 4% 多聚甲醛固定 30 min, 流式细胞术检测各组荧光强度。

1.2.6 pMIR-PKC α 3'UTR 荧光素酶报告基因载体构建及活性检测 PKC α 3'UTR WT 及 Mutant PKC α 3'UTR 经退火、双酶切处理后, 插入荧光素酶报告基因载体 pMIR-REPORT, 构建 pMIR-PKC α 3'UTR WT 载体及 Mutant pMIR-PKC α 3'UTR 载体。将 HEK293 细胞接种于 96 孔板中, 待 90% 细胞贴壁后, 采用脂质体 2000 包裹转染, 分组包括 miR-NC 和 pMIR-PKC α 3'UTR WT 组, miR-142 mimics 和 pMIR-PKC α 3'UTR WT 组, miR-NC 和 Mutant pMIR-PKC α 3'UTR 组, miR-142 mimics 组。转染 24 h 后, 采用美国 Promega 公司 GloMax20/20 型化学发光检测仪检测各组荧光强度。

1.2.7 免疫印迹检测 采用细胞裂解液裂解 RAW264.7 细胞, 低温条件下 $14\,000 \text{ r/min}$ 离心 15 min, 收集上清液并测定蛋白浓度。取 $20 \mu\text{g}$ 总蛋白, 经 8% 十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分离后, 采用聚偏氟乙烯膜(PVDF)转膜, 5% 脱脂奶粉封闭 1 h, 采用磷酸盐吐温缓冲液(PBST)洗膜 3 次; 滴加 PKC α 一抗(稀释比例 1 : 800)、GAPDH 一抗(稀释比例为 1 : 5 000), 4°C 孵育过夜; PBST 洗膜 3 次, 滴加辣根过氧化物酶(HRP)标记山羊抗小鼠 IgG 抗体, 孵育 40 min, 洗膜 3 次后暗室曝光。

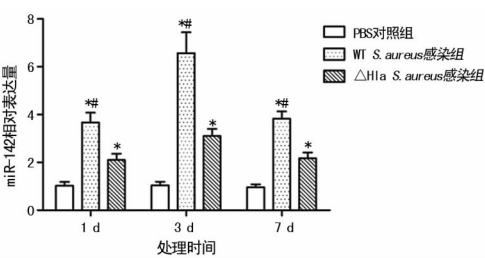
1.3 统计学处理 采用 SPSS22.0 软件进行数据处理和统计学分析。计量资料组间比较采用非配对样本 *t* 检验。 $P < 0.05$ 为比较差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 Hla 上调金葡菌感染皮肤组织 miR-142 表达 与 PBS 对照组相比, 金葡菌感染后 1、3、7 d, WT *S. aureus* 感染组和 $\Delta\text{HlaS. aureus}$ 感染组小鼠皮肤组织 miR-142 表达水平升高, 且 WT *S. aureus* 组 miR-142 表达水平高于 $\Delta\text{HlaS. aureus}$ 感染组($P < 0.05$), 见图 1。

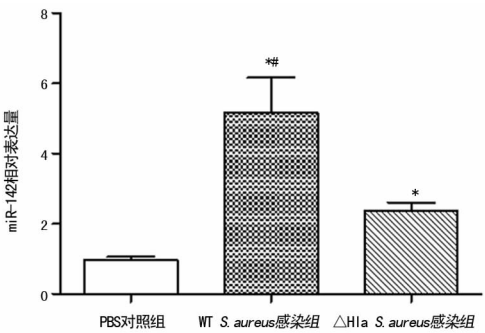
2.2 Hla 上调金葡菌感染巨噬细胞 miR-142 表达 与 PBS 对

照组相比, 金葡菌感染后 6 h, WT *S. aureus* 感染组和 $\Delta\text{HlaS. aureus}$ 感染组巨噬细胞 miR-142 表达水平升高, 且 WT *S. aureus* 感染组 miR-142 表达水平高于 $\Delta\text{HlaS. aureus}$ 感染组($P < 0.05$), 见图 2。



注: 与 PBS 对照组比较, * $P < 0.05$; 与 $\Delta\text{HlaS. aureus}$ 感染组比较, # $P < 0.05$ 。

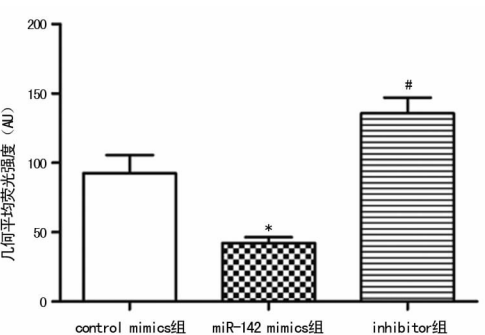
图 1 各小鼠模型组皮肤组织 miR-142 表达水平



注: 与 PBS 对照组比较, * $P < 0.05$; 与 $\Delta\text{HlaS. aureus}$ 感染组比较, # $P < 0.05$ 。

图 2 感染 6 h 后各组小鼠模型巨噬细胞 miR-142 表达水平

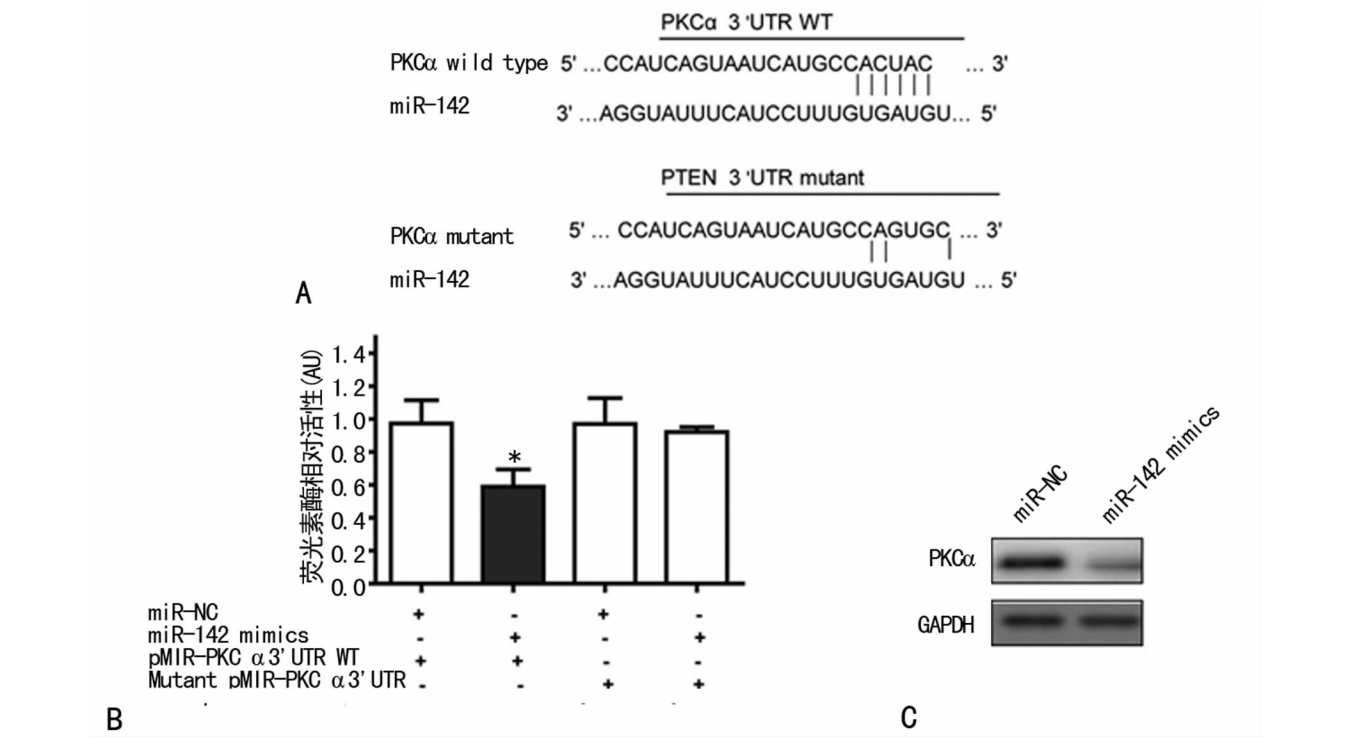
2.3 miR-142 抑制 RAW264.7 巨噬细胞吞噬能力 向 RAW264.7 巨噬细胞转染 control mimics、miR-142 mimics 和 inhibitor, 结果显示, 与 control mimics 组相比, miR-142 mimics 组几何平均荧光强度下降($P < 0.05$), 与 control mimics 组相比, inhibitor 组几何平均荧光强度升高($P < 0.05$), 见图 3。



注: 与 control mimics 组比较, * $P < 0.05$ 。

图 3 miR-142 抑制 RAW264.7 巨噬细胞吞噬能力

2.4 miR-142 靶向调控 PKC α 构建的 PKC α 3'UTR 及 Mutant PKC α 3'UTR 荧光素酶报告基因载体 miR-142 靶基因序列见图 4A。荧光素酶活性检测结果显示, miR-142 mimics 和 pMIR-PKC α 3'UTR WT 转染组荧光强度较 miR-NC 和 pMIR-PKC α 3'UTR WT 转染组显著降低($P < 0.05$), 见图 4B。蛋白印迹检测结果显示, miR-142 mimics 转染组 PKC α 蛋白质表达水平较 miR-NC 转染组显著下调, 见图 4C。



注:图 A 为 miR-142 靶基因序列。图 B 为各转染组荧光素酶活性检测结果;与 miR-NC 和 pMIR-PKCα3'UTR WT 转染组比较,* $P<0.05$ 。图 C 为 RAW264.7 细胞 PKCα 蛋白水平免疫印迹法检测结果。

图 4 miR-142 靶向调控 PKCα 表达水平

3 讨 论

miRNAs 对炎性细胞功能具有重要的调控作用,特别是在病原识别和天然免疫信号转导方面。本研究结果显示,金葡菌分泌的 H1a 能够促进金葡菌感染后的皮肤组织和巨噬细胞 miR-142 表达水平上调,而巨噬细胞 miR-142 表达水平与其对金葡菌的吞噬能力密切相关。有研究显示,包皮垢分支杆菌无毒株感染可诱导小鼠来源的 J774. A1 巨噬细胞系表达 miR-142-3p,过表达 miR-142-3p 能够抑制髓性细胞的吞噬能力,且 miR-142-3p 通过靶向下调肌动蛋白结合蛋白 N-wasp 表达水平,影响肌动蛋白代谢动力学,最终影响巨噬细胞的吞噬效率^[8]。

PKCα 属于丝氨酸/苏氨酸激酶家族,能够调控多种细胞功能,包括细胞分化、凋亡和脂多糖(LPS)信号刺激转导等^[9]。本研究首次通过双荧光素酶报告基因实验证实,PKCα 是 miR-142 靶向调控基因之一,巨噬细胞 RAW264.7 细胞过表达 miR-142 能够显著下调 PKCα 表达水平。PKCα 能够控制巨噬细胞中胞内病原菌的感染,并在吞噬体成熟过程中发挥重要作用;杜氏利什曼原虫的 LPS 能够影响外周吞噬体内肌动蛋白的聚集,而此过程与 PKCα 的转位有关^[7-10]。上述研究均证实 PKCα 在调控细菌吞噬方面具有重要作用,同时也支持本研究发现的 PKCα 调控巨噬细胞吞噬金葡菌的作用。

综上所述,金葡菌分泌的 H1a 能够促进巨噬细胞表达 miR-142;miR-142 通过靶向下调与细胞吞噬功能相关的 PKCα,抑制巨噬细胞吞噬可分泌 H1a 的金葡菌。本研究证实金葡菌 H1a 通过调控 miRNAs,逃逸机体的免疫吞噬和杀伤作用,为防治金葡菌皮肤感染和炎性损伤提供了一定的依据和实验基础。

参考文献

[1] Hill PB, Imai A. The immunopathogenesis of staphylococcal skin infections-a review[J]. Comp Immunol Microbiol

Infect Dis, 2016, 49(49):8-28.

[2] Totte JE, Van der feltz WT, bode LG, et al. A systematic review and meta-analysis on Staphylococcus aureus carriage in psoriasis, acne and rosacea[J]. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2016, 35(10):1069-1077.

[3] Berube BJ, Wardenburg JB. Staphylococcus aureus alpha-toxin: nearly a century of intrigue[J]. Toxins (Basel), 2013, 5(6):1140-1166.

[4] Qin L, Da F, Fisher EL, et al. Toxin mediates sepsis caused by methicillin-resistant Staphylococcus epidermidis[J/OL]. PLoS Pathog, 2017-02-2[2017-04-16], <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC28151994>.

[5] Cruz KJ, De Oliveira AR, Morais JB, et al. Role of microRNAs on adipogenesis, chronic low-grade inflammation, and insulin resistance in obesity[J]. Nutrition, 2017, 35(1):28-35.

[6] Jurkin J, Schichl YM, Koeffel R, et al. miR-146a is differentially expressed by myeloid dendritic cell subsets and desensitizes cells to TLR2-dependent activation[J]. J Immunol, 2010, 184(9):4955-4965.

[7] Wang XS, Gong JN, Yu J, et al. MicroRNA-29a and microRNA-142-3p are regulators of myeloid differentiation and acute myeloid leukemia[J]. Blood, 2012, 119(21):4992-5004.

[8] Bettencourt P, Marion S, Pires D, et al. Actin-binding protein regulation by microRNAs as a novel microbial strategy to modulate phagocytosis by host cells; the case of N-Wasp and miR-142-3p[J/OL]. Front Cell Infect Microbiol, 2013-06-05[2017-04-16], <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3672780>. (下转第 1446 页)

83.3%。Caviglia 等^[6]对 247 例消化道肿瘤患者进行血清肿瘤型 M2-PK 检测,结果显示消化道肿瘤患者血清肿瘤型 M2-PK 水平高于健康者($P<0.05$),其诊断特异度为 86%,灵敏度为 79%。本研究采用 ELISA 方法检测结直肠癌患者粪便标本肿瘤型 M2-PK 阳性率为 80.00%,血清标本阳性率为 64.00%,略低于国外学者的报道。虽然上述研究提示 ELISA 检测结直肠癌患者粪便和血清肿瘤型 M2-PK 有一定的特异性和敏感性,但同时也存在假阳性或假阴性结果,不适用于结直肠癌早期诊断^[8-9]。

实时荧光定量 PCR 具有较高的灵敏度、特异度,可实现快速定量检测,因此临床应用较为广泛,尤其适用于肿瘤相关基因检测^[9-10]。本研究采用自建实时荧光定量 PCR 方法检测 200 例结直肠癌患者粪便标本肿瘤型 M2-PK DNA,检出阳性 185 例,阳性率为 92.50%,特异度和灵敏度分别为 93.02%和 92.13%;相同标本 ELISA 方法检出阳性 160 例,阳性率为 80.00%,特异度和灵敏度分别为 78.66%和 79.07%;PCR 方法检测粪便标本肿瘤型 M2-PK 对结直肠癌的诊断特异度和灵敏度高于 ELISA($P<0.05$),提示实时荧光定量 PCR 检测粪便标本肿瘤型 M2-PK DNA 对结直肠癌具有较大的诊断价值。

本研究构建了肿瘤型 M2-PK DNA 重组表达质粒,经 PCR 扩增和产物测序证实质粒构建成功,并以重组质粒为模板建立了可用于肿瘤型 M2-PK DNA 检测的实时荧光定量 PCR 方法。同时,滴度稀释法检测结果显示,自建 PCR 方法对肿瘤型 M2-PK DNA 的检测灵敏度达到 10 copy/mL;特异性分析结果显示,自建 PCR 方法可检出肿瘤型 M2-PK DNA,对肌肉型 M2-PK DNA 和 M1-PK DNA 检测结果为阴性,具有较高的特异性;重复性分析结果显示,该方法检测批内 CV 为 0.3%~1.3%,批间 CV 为 1.1%~2.9%,说明其具有良好的重复性。由此可见,本研究建立的实时荧光定量 PCR 方法对肿瘤型 M2-PK DNA 的检测敏感性高、特异性强,为结直肠癌早期筛查和诊断提供了一种新的检测方法^[11]。

本研究结果显示,结直肠癌患者粪便和血清肿瘤型 M2-PK 水平与肿瘤病理分期存在一定的相关性,随着病理分期升高,粪便和血清肿瘤型 M2-PK 水平逐渐升高,机制可能在于肿瘤细胞生长过程中不断产生肿瘤型 M2-PK,并分泌进入肿瘤组织外部和外周血中;肿瘤细胞坏死凋亡也增加了肿瘤型 M2-PK 的释放,从而在排泄物中可检出肿瘤型 M2-PK^[1]。因此,肿瘤型 M2-PK 对结直肠癌的诊断具有较大的临床意义。Ewald 等^[7]的研究也证实肿瘤型 M2-PK 表达量与肿瘤 Duke's 分期和 TNM 分级相关;诊断大肠癌的总体灵敏度达到 78%,各期诊断灵敏度从 T1 期的 60%上升到 T4 期的 100%,从 Duke's 分期 A 期的 60%上升到 Duke's 分期 D 期的 90%。因此,肿瘤型 M2-PK 是可用于结直肠癌筛查和诊断的生物标志物之一。

综上所述,采用实时荧光定量 PCR 检测粪便标本肿瘤型 M2-PK DNA 具有较高的诊断灵敏度和特异度,优于 ELISA,

是适用于结直肠癌早期诊断的准确、可靠、敏感、特异的实验室检测方法^[12]。

参考文献

- [1] Munoz-Colmenero A, Fernandez-Suarez A, Fatela-Cantillo D, et al. Plasma tumor M2-Pyruvate kinase levels in different cancer types [J]. *Anticancer Res*, 2015, 35 (7): 4271-4276.
- [2] 喻鑫, 刘弋. tM2-PK 蛋白在结直肠癌中的表达及临床意义 [J]. *安徽医科大学学报*, 2014, 26(2): 236-239.
- [3] Leen R, Seng-Lee C, Holleran G, et al. Comparison of faecal M2-PK and FIT in a population-based bowel cancer screening cohort [J]. *Eur J Gastroenterol Hepatol*, 2014, 26(5): 514-518.
- [4] Kim YC, Kim JH, Cheung DY, et al. The usefulness of a novel screening kit for colorectal cancer using the immuno-chromatographic fecal tumor M2 pyruvate kinase test [J]. *Gut Liver*, 2015, 9(5): 641-648.
- [5] 吴文娟, 周国华. 粪便 DNA 突变检测在快速筛选大肠癌中的应用 [J]. *遗传*, 2006, 28(9): 1161-1166.
- [6] Caviglia GP, Cabianca L, Fagoonee S, et al. Colorectal cancer detection in an asymptomatic population: fecal immunochemical test for hemoglobin vs. fecal M2-type pyruvate kinase [J]. *Biochem Med (Zagreb)*, 2016, 26(1): 114-120.
- [7] Ewald N, Schaller M, Bayer M, et al. Fecal pyruvate kinase-M2 (tumor M2-PK) measurement: a new screening concept for colorectal cancer [J]. *Anticancer Res*, 2007, 27 (4): 1949-1952.
- [8] Meng W, Zhu HH, Xu ZF, et al. Serum M2-pyruvate kinase: a promising non-invasive biomarker for colorectal cancer mass screening [J]. *World J Gastrointest Oncol*, 2012, 4(6): 145-151.
- [9] 沈炜, 俞士尤, 邵正才, 等. 新辅助化疗与营养支持对老年结肠癌患者 T 细胞 COX-2 及 tM2-PK 水平的影响 [J]. *现代生物医学展*, 2015, 15(36): 7135-7138.
- [10] 宋均飞, 刘弋. EGFR, HER2 在结直肠癌患者血清与组织中的表达及其临床意义分析 [J]. *中华疾病控制杂志*, 2016, 20(4): 403-407.
- [11] 张曹, 杨银学, 杜勇, 等. 大肠癌患者粪便与癌组织 APC 基因突变检测的一致性研究 [J]. *宁夏医科大学学报*, 2014, 36(4): 364-366.
- [12] Koga Y, Yamazaki N, Matsumura Y. Fecal biomarker for colorectal cancer diagnosis [J]. *Rinsho Byori*, 2015, 63(3): 361-368.

(收稿日期: 2016-11-12 修回日期: 2017-01-18)

(上接第 1443 页)

- [9] Chandrika G, Natesh K, Ranade D, et al. Suppression of the invasive potential of Glioblastoma cells by mTOR inhibitors involves modulation of NFkappaB and PKC-alpha signaling [J/OL]. *Sci Rep*, 2016-03-04 [2017-04-16], <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC46940200>.

- [10] Ng Y, Desjardins M, Descoteaux A. Proteomic analysis reveals a role for protein kinase C-alpha in phagosome maturation [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004, 319 (3): 810-816.

(收稿日期: 2017-01-09 修回日期: 2017-03-16)