

• 论 著 •

Crk1/2 与 CrkL 缺失导致足细胞损伤的蛋白质组学分析*

杜佳琳,段楠,逢璐,黄海明,黄辰炜,李海霞[△]
(北京大学第一医院检验科,北京 100034)

摘要:目的 探讨 Crk1/2 与 CrkL 缺失导致足细胞损伤过程中胞内蛋白表达变化情况。方法 利用小干扰 RNA 转染方法对足细胞内 Crk1/2 与 CrkL 进行单敲降及双敲降;通过非标记液相色谱串联质谱方法对 Crk1/2 与 CrkL 单敲降及双敲降的足细胞进行蛋白质组学分析;对得到的差异蛋白进行基因本体(GO)分析和京都基因和基因组百科全书(KEGG)分析;采用 Western blot 试验对差异蛋白进行验证。结果 Crk1/2 与 CrkL 单敲降及双敲降的足细胞与正常足细胞比较,共发现 98 个差异蛋白,GO 分析和 KEGG 分析提示多数上调蛋白富集在代谢途径,多数下调蛋白富集在信号转导途径,如抑制和激活蛋白 1、磷脂酰肌醇三激酶-丝氨酸/苏氨酸激酶和环磷酸腺苷信号途径。经 Western blot 试验验证,细胞代谢相关蛋白超氧化物歧化酶 2(SOD2)表达上调,信号转导相关蛋白 LRP1 表达上调、c-Jun 表达下调,细胞骨架损伤相关蛋白 TPM4 表达上调、Cdc42EP1 表达下调。结论 Crk1/2 与 CrkL 缺失可通过调节代谢途径及相关信号转导途径导致足细胞损伤,TPM4、SOD2、LRP1、c-Jun 和 Cdc42EP1 参与损伤过程,具体分子机制值得进一步探讨。

关键词:Crk1/2; CrkL; 足细胞损伤; 蛋白质组学
DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2020.21.005 **中图法分类号:**R446.9
文章编号:1673-4130(2020)21-2580-06 **文献标识码:**A

Proteomics analysis in Crk1/2 and CrkL knockdown podocyte*

DU Jialin, DUAN Nan, PANG Lu, HUANG Haiming, HUANG Chenwei, LI Haixia[△]
(Department of Clinical Laboratory, First Hospital of Peking University, Beijing 100034, China)

Abstract: **Objective** To explore the changes of intracellular protein during podocyte injury caused by the absence of Crk1/2 and CrkL. **Methods** Specific knockdown of Crk1/2, CrkL and both by transfected with indicated small interfering RNA. Label-free liquid chromatography tandem mass spectrometry method was used to compare the protein profiles in Crk1/2, CrkL or both knockdown podocytes and normal podocytes. Gene Ontology (GO) analysis and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes(KEGG) analysis were performed to characterize the properties of the differentially expressed proteins. Western blot was used to verify the differentially expressed proteins. **Results** A total 98 proteins were identified to be significantly altered in Crk1/2, CrkL and both knockdown podocytes. GO analysis and KEGG analysis revealed that most of upregulated proteins were involved in metabolic process and most of downregulated proteins were involved in signaling transduction pathway such as Rap1, PI3K-Akt and cAMP signaling pathway. According to Western blot verification, cell metabolism-related protein SOD2 was up-regulated, signal transduction-related protein LRP1 was up-regulated, while c-Jun was down-regulated, cytoskeletal-related protein TPM4 was up-regulated, while Cdc42EP1 was down-regulated. **Conclusion** The loss of Crk1/2 and CrkL may cause podocyte injury by regulating metabolic process and related signal transduction pathway. TPM4, SOD2, LRP1, c-Jun and Cdc42EP1 were involved in the damage process and the specific molecular mechanisms were worth further discussion.

Key words:Crk1/2; CrkL; podocyte; proteomics

足细胞是锚定在肾小球基底膜的高度分化终末细胞,具有复杂的骨架结构,是肾小球滤过屏障的重要组成部分,其损伤是导致肾小球蛋白尿的主要机制,并且与各类肾小球疾病的发生和发展密切相关。

* 基金项目:国家自然科学基金项目(82072369)。
作者简介:杜佳琳,女,在读硕士,主要从事肾脏病分子机制及蛋白质组学生物标志物筛选方面的研究。 [△] 通信作者, E-mail: bdyylhx@126.com。
本文引用格式:杜佳琳,段楠,逢璐,等. Crk1/2 与 CrkL 缺失导致足细胞损伤的蛋白质组学分析[J]. 国际检验医学杂志, 2020, 41(21): 2580-2585.

关^[1]。在足细胞损伤模型中,足细胞内某些蛋白的表达水平会发生明显变化,特定基因的缺失会导致足细胞结构与功能受损,因此,明确导致足细胞损伤的特定分子,对于治疗肾小球疾病至关重要^[2-3]。Crk 家族蛋白 Crk1/2 与 CrkL 是重要的信号转导蛋白,二者结构相似,功能互补,参与细胞黏附、迁移、增殖、凋亡及免疫等多个生物过程,在许多肿瘤疾病中呈高表达,并且对维持正常细胞的形态和功能至关重要^[4]。既往研究表明,足细胞 Crk1/2 与 CrkL 缺失会导致板状伪足形成异常,细胞骨架重排及细胞黏附、迁移与活力受损^[5-6]。尽管 Crk1/2 与 CrkL 在足细胞中发挥了重要生物作用,但此过程中涉及的上、下游分子机制尚不明确。为进一步了解 Crk1/2 与 CrkL 在足细胞中的作用,本研究采用非标记定量蛋白质组学方法对 Crk1/2 与 CrkL 单敲降及双敲降的足细胞和正常足细胞中的蛋白质谱进行比较,根据所得信息分析由 Crk 家族蛋白缺失介导的复杂蛋白网络,进一步探索肾小球疾病的病理生理机制。

1 材料与方法

1.1 材料 条件永生化人足细胞(HPCs)由美国安德森癌症中心龙慧茵教授馈赠;Opti-MEM 低血清培养基(美国 Gibco 公司);小干扰 RNA(siRNA,中国生工生物工程股份有限公司);转染试剂 Lipofectamine RNAiMAX(美国 Invitrogen 公司);抗 Crk1/2 抗体(美国 BD 公司,1:2 000)、抗 CrkL 抗体(英国 Abcam 公司,1:500)、抗 LRP1 抗体(英国 Abcam 公司,1:2 000)、抗超氧化物歧化酶 2(SOD2)抗体(英国 Abcam 公司,1:2 000)、抗 TPM4 抗体(英国 Abcam 公司,1:3 000)、抗 c-Jun 抗体(英国 Abcam 公司,1:3 000)、抗 Cdc42EP1 抗体(英国 Abcam 公司,1:4 000)、抗 GAPDH 抗体(英国 Abcam 公司,1:2 000)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 HPCs 于含有 10% 胎牛血清、1% 青霉素/链霉素和 1× 胰岛素-转铁蛋白-硒(ITS)的 RPMI1640 培养基中传代培养。增殖条件为 33℃,当细胞密度达到 70%~80%时,转入 37℃,培养基去除 ITS,培养 10~14 d 诱导分化,之后用于试验。

1.2.2 试验分组及 siRNA 转染 试验分为 4 组:空白对照组(转染阴性对照 siRNA, siCtrl)、Crk1/2 单敲降组(转染 Crk1/2 siRNA, siCrk1/2)、CrkL 单敲降组(转染 CrkL siRNA, siCrkL)、Crk1/2 与 CrkL 双敲降组(共转染 Crk1/2 siRNA 与 CrkL siRNA, siCrk1/2 + siCrkL)。当分化好的 HPCs 细胞密度达到 70%~80%时,利用 Opti-MEM 低血清培养基稀释 siRNA 与 Lipofectamine RNAiMAX,二者混合均匀,室温孵育 10 min 后,滴加至细胞培养基中。转染 72 h 后,收集细胞提取蛋白,采用 Western blot 试验进行沉默效率验证。

1.2.3 Western blot 分析 转染 72 h 后,采用 RIPA

裂解液提取细胞总蛋白,4℃条件下以 1 200 r/min 离心 15 min 后取上清液用于 Western blot 试验。Western blot 试验过程如下:将 20 μg 蛋白上样至浓度为 10% 的分离胶中进行电泳分离,然后转移至聚偏氟乙烯膜。转膜完毕后用 5% 脱脂奶粉室温孵育 1 h,之后加入一抗,4℃过夜。第 2 天复温后用 Western blot 试验洗涤液洗膜,5 min×3 次,然后加入辣根过氧化物酶标记的二抗室温孵育 1 h,再次用 Western blot 试验洗涤液洗膜,5 min×3 次。采用凝胶成像分析系统进行显影,采用 Image J 软件对各条带进行灰度扫描。各试验独立重复 3 次。

1.2.4 液相色谱串联质谱(LC-MS/MS)分析 采用 Bradford 方法对细胞总蛋白进行定量,60 μg 蛋白中加入 5 μL 二硫苏糖醇(1 mol/L)室温孵育 1 h,然后加入 20 μL 吡啶乙酸(1 mol/L)避光室温孵育 1 h,采用离心法和超滤法去除 DTT、IAA 和低分子物质,按照 50:1 的比例在 37℃下孵育 12~16 h 进行胰蛋白酶消化。LC-MS/MS 系统包括 Agilent 1100 quaternary 高效液相色谱仪和 Q-Exactive Fusion Lumos 质谱仪。样本由自动进样器上样到 C18 反向柱(C18 3 μm 100 μm×2 cm),再经分析柱(C18 1.9 μm 150 μm×12 cm)分离,洗脱液 A 为 0.1% 甲酸/H₂O,洗脱液 B 为 0.08% 甲酸/乙腈,流速为 300 nL/min,洗脱时间为 75 min。采用数据依赖采集模式进行质谱分析,相关参数设置如下:质谱扫描离子质荷比为 350~1 550 m/z,扫描分辨率为 6 000,自动增益控制系数(AGC)为 400 000,最大离子时间为 50 ms。二级质谱相关参数设置如下:扫描分辨率为 15 000,AGC 为 20 000,最大离子时间为 35 ms。所得质谱数据采用 Proteome Discoverer 软件在 Uniprot 数据库中进行蛋白质检索鉴定。肽段和蛋白质鉴定错误发现率均小于 0.01,允许最小肽段数目为 1 个。当上调蛋白差异倍数为 1.5、下调蛋白差异倍数为 0.67 时,视为明显差异蛋白。采用 DAVID 数据库(<https://david.ncifcrf.gov/>)进行基因本体(GO)分析和京都基因和基因组百科全书(KEGG)分析,采用 STRING 数据库(<http://www.string-db.org/>)进行蛋白相互作用分析。

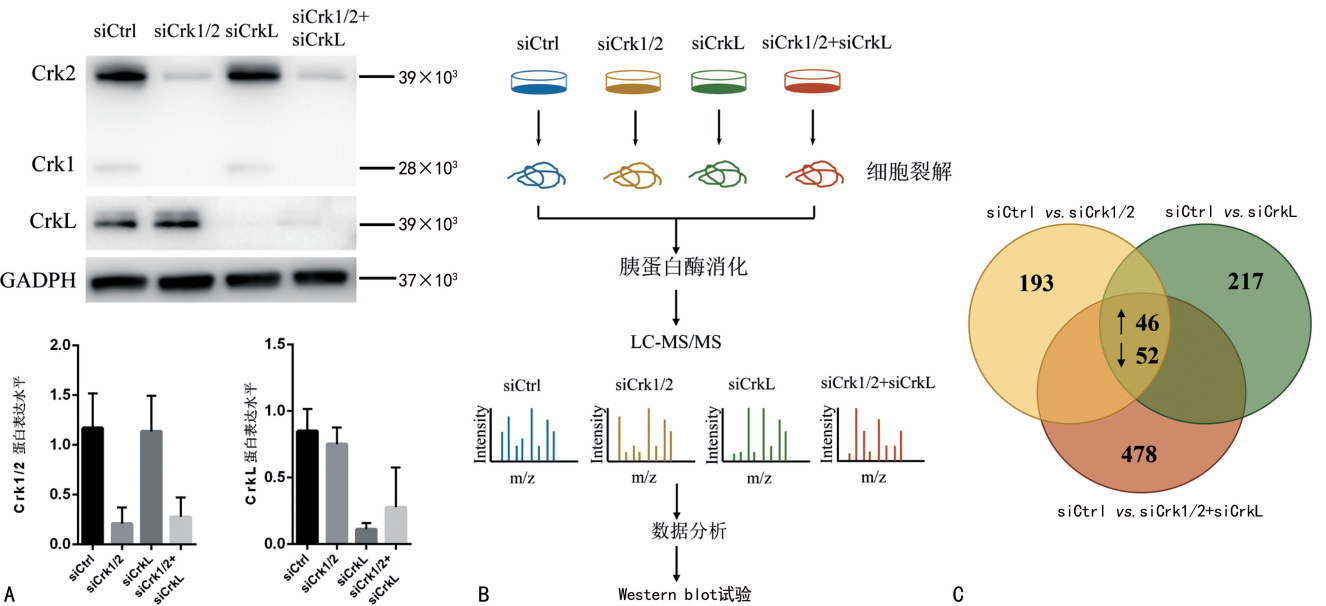
1.3 统计学处理 采用 SPSS19.0 统计软件进行数据分析处理。采用 GraphPad Prism 6.0 软件制作统计图。采用 *t* 检验、Mann-Whitney *U* 检验和 ANOVA 检验进行比较。以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Crk1/2 与 CrkL 单敲降及双敲降足细胞蛋白质组学分析及差异蛋白筛选 为了探究 Crk1/2 与 CrkL 在足细胞中的调节作用,本研究通过转染 si-Crk1/2、siCrkL 及 siCrk1/2 + siCrkL 的方法实现足细胞内 Crk1/2 与 CrkL 的单敲降及双敲降。如图 1A

所示,siRNAs 转染足细胞后,Crk1/2 与 CrkL 的表达水平与空白对照组比较明显降低。为了探讨 Crk1/2 与 CrkL 缺失对胞内蛋白表达的改变,本研究对 3 次独立试验的特异性敲降足细胞进行了蛋白质组学分析,相关工作流程如图 1B 所示。利用蛋白质组学分析平台对质谱数据进行处理和数据库检索。与 siCtrl

组比较,siCrk1/2 组有 291 个差异蛋白,siCrkL 组有 315 个差异蛋白,siCrk1/2+siCrkL 组有 576 个差异蛋白。在这些差异蛋白中,有 46 个蛋白在 3 个试验组中均表达上调,有 52 个蛋白在 3 个试验组中均表达下调,如图 1C 所示。下一步将对这 98 个差异蛋白进行进一步分析。



注:A 为 siRNA 转染后足细胞 Crk1/2 与 CrkL 的表达情况;B 为定量蛋白质组学工作流程图;C 为差异蛋白筛选。
图 1 Crk1/2 与 CrkL 单敲降及双敲降蛋白质组学分析及差异蛋白筛选

2.2 Crk1/2 与 CrkL 单敲降及双敲降足细胞中差异蛋白通路分析 为了探究 Crk1/2 与 CrkL 基因敲降相关的生物学功能和途径,本研究对 98 个差异蛋白进行了 GO 分析和 KEGG 分析。如图 2、图 3 所示,生物过程分析提示大多数上调和下调蛋白质涉及以下 3 个过程:(1)细胞进程,包括肌动蛋白细胞骨架调节、信号转导等;(2)生物调节过程,包括细胞形态调节和细胞凋亡过程调控等;(3)代谢过程,包括脂质代谢过程和氧化还原过程等。分子功能分析显示,上调和下调的蛋白质主要富集在结合作用、蛋白结合、催化活性和水解酶活性等方面。此外,细胞组分分析提

示,上调和下调蛋白质主要为细胞质成分。如图 4 所示,对上调差异蛋白进行 KEGG 分析显示,多数蛋白参与代谢途径,包括果糖和甘露糖代谢、淀粉和蔗糖代谢、半乳糖代谢等。图 5 对下调差异蛋白进行 KEGG 分析显示,Crk1/2 与 CrkL 缺失会影响足细胞内多种信号通路,包括抑制和激活蛋白 1、磷脂酰肌醇三激酶-丝氨酸/苏氨酸激酶和环磷酸腺苷等信号通路。这些差异蛋白的分布和功能为寻找与 Crk1/2、CrkL 的异常表达引起足细胞功能障碍有关的分子成分和信号通路提供了线索。

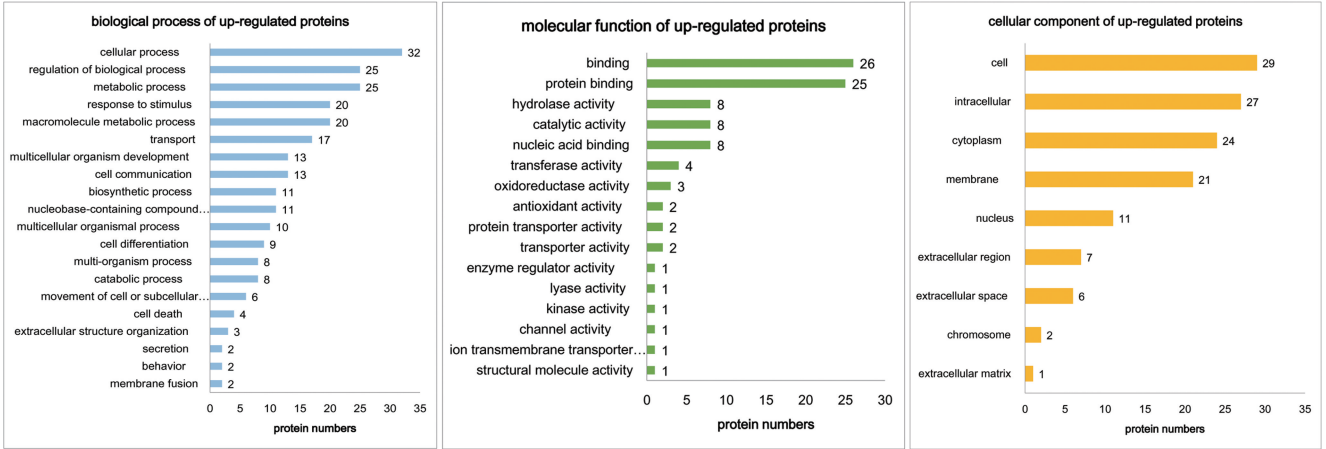


图 2 上调差异蛋白的 GO 分析

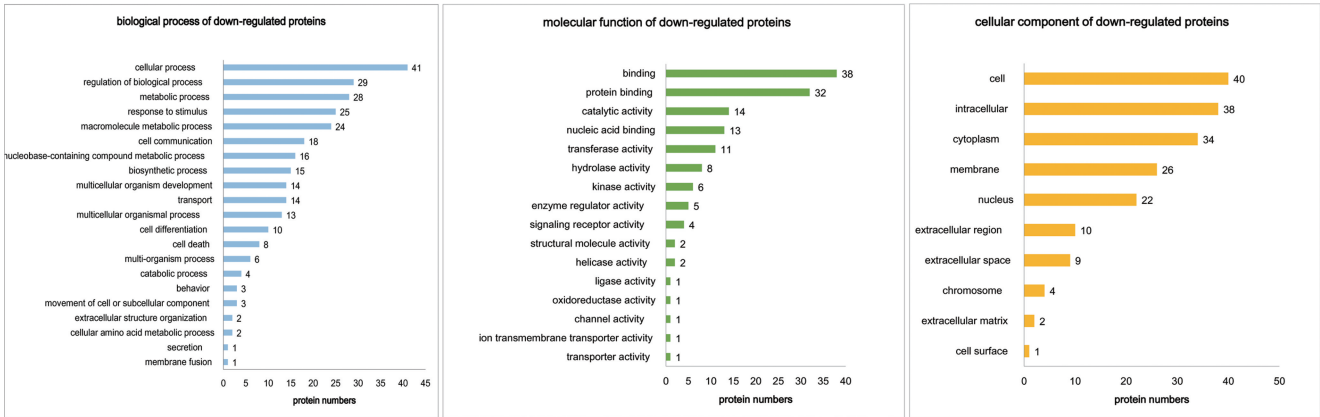


图 3 下调差异蛋白的 GO 分析

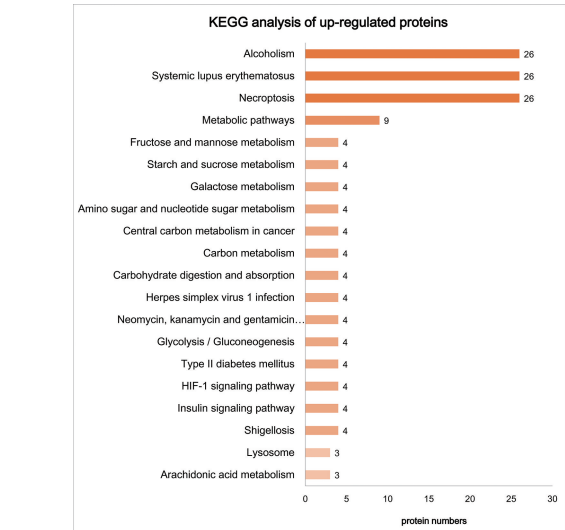


图 4 上调差异蛋白的 KEGG 分析

2.3 Crk1/2、CrkL 与差异蛋白间的网络关系 为了进一步分析 98 个差异蛋白之间的网络关系,本研究将其上传至 STRING 蛋白质相互作用数据库进行分析,结果发现,这些差异蛋白与 Crk1/2 和 CrkL 之间高度互连。此外,一些软件预测的信号转导分子,如丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)和雷帕霉素靶蛋白(mTOR)也出现在关系网中。转录因子 c-Jun 是 MAPK 的下游激活靶点,有调节细胞增殖、凋亡和分化的作用。在 98 个差异蛋白中,c-Jun 与其他差异蛋白及被预测的蛋白质的连接数目最多,高达 17 个。

与 c-Jun 相连蛋白包括 SOD2、细胞间黏附分子 1(ICAM1)和酪氨酸蛋白激酶等,这些蛋白质的连接为探究 Crk1/2 和 CrkL 缺失引起足细胞损伤和遗传性 Digeorge 综合征的机制提供了更多信息。

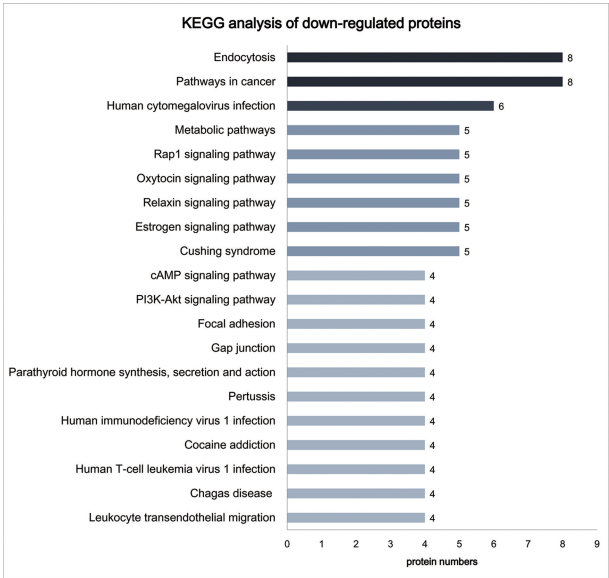
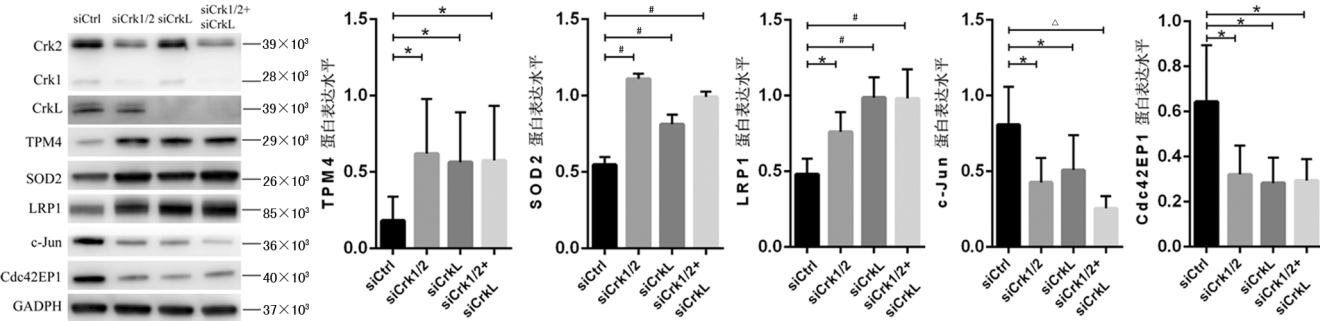


图 5 下调差异蛋白的 KEGG 分析

2.4 目标蛋白 Western blot 试验验证 本研究选择 5 个相关差异蛋白进行 Western blot 试验验证,并准备在下一步试验中继续进行深入的分子机制研究。如图 6 所示,上述 5 个蛋白的 Western blot 试验验证结果与蛋白质组学数据相一致,证明了蛋白质组学结果的可靠性。



注: * $P < 0.05$, $\Delta P < 0.01$, # $P < 0.001$ 。

图 6 TPM4、SOD2、LRP1、c-Jun 和 Cdc42EP1 的蛋白表达水平

3 讨 论

足细胞损伤是引起肾小球疾病的主要原因,既往研究表明,足细胞 Crk 家族蛋白的特异性缺失会导致伪足形成受阻^[5-6]。为了研究 Crk 家族蛋白缺失引起足细胞功能障碍的分子机制,本研究分别对 Crk1/2、CrkL 单敲降及双敲降的足细胞进行了蛋白质组学研究,以识别 Crk1/2 与 CrkL 调控的差异蛋白。

通过对上调和下调差异蛋白进行生物过程分析发现,上调的大部分差异蛋白都参与了代谢途径,如氨基糖和核苷酸代谢、半乳糖代谢、碳代谢等。近年来,足细胞代谢紊乱已成为肾小球疾病的重要因素。线粒体功能障碍和代谢异常可以在糖尿病肾病、局灶节段性肾小球硬化和慢性肾脏病中观察到,并被认为是肾脏疾病进展的主要驱动因素^[7]。本研究提示,在 Crk1/2 和 CrkL 缺失导致的足细胞损伤过程中,代谢紊乱是一个非常重要的损伤机制。对下调差异蛋白进行 KEGG 分析发现,大部分蛋白富集在信号转导通路(如 Rap1、cAMP 和 PI3K-Akt 信号通路等)上。STRING 分析也显示差异蛋白与其他信号转导蛋白(如 mTOR、MAPK8 和 MAPK9 等)有密切关系。因此,生物信息学分析为 Crk1/2 与 CrkL 缺失引起足细胞功能障碍的研究提供了新思路。

在 98 个差异蛋白中,有 5 个与代谢、信号转导和肌动蛋白骨架有关的差异蛋白已被 Western blot 试验证实。TPM4 是一种原肌球蛋白,是微丝骨架的主要结构,海马神经元 LRRK2 的缺失会导致生长锥中产生更多的 TPM4 来稳定新合成的肌动蛋白微丝^[8]。然而,对 TPM4 在肾脏疾病中的表达情况及其生物学功能还暂不清楚。本研究结果显示,足细胞内 Crk1/2 与 CrkL 缺失导致足细胞骨架重排的过程伴随着 TPM4 表达增加。因此,推测 TPM4 的表达上调可能是肌动蛋白丝断裂后足细胞内的一种自我调节现象,其是否参与肾脏疾病的发病值得进一步探讨。

细胞代谢相关蛋白 SOD2 为线粒体乙酰化酶 3 (SIRT3)下游分子,可通过清除超氧化物来调节细胞活性氧(ROS)水平。有研究发现,经醛固酮或 H₂O₂ 刺激的足细胞胞内 ROS 和 SOD2 生成增加,刺激前用人参皂苷-rg1 处理足细胞可降低 SOD2 和 ROS 水平,防止足细胞损伤^[9]。本研究中,SOD2 在 Crk1/2 与 CrkL 单敲降及双敲降足细胞中表达上调,其可能是应对胞内 ROS 水平升高的调节机制,过多的 ROS 会导致 DNA、蛋白质和脂类氧化,损害足细胞内的细胞器,Crk1/2 与 CrkL 敲降后可能会造成足细胞内 ROS 的异常表达。此外,一些膜性肾病患者足细胞 SOD2 表达水平增加,并可作为自身抗原,导致血浆中出现抗 SOD2 抗体,最终激活免疫应答攻击足细

胞^[10]。因此,控制 SOD2 的表达对避免足细胞损伤有重要意义,Crk1/2、CrkL 缺失导致的足细胞 SOD2 表达水平升高是肾小球疾病的危险因素。

LRP1 是低密度脂蛋白受体家族的成员,具有超过 40 种不同的配体,介导多种细胞内信号通路,在 Schwan 细胞中,LRP1 表达下调可通过抑制 Rac1 和激活 RhoA 来增加细胞黏附^[11]。GO 和 KEGG 分析表明,许多差异蛋白与代谢过程与信号通路有关^[11]。TPM4 在稳定微丝骨架结构中起重要作用,在 3 个试验组中均表达上调。SOD2 是一种重要的线粒体抗氧化剂,为 SIRT3 的下游介质,调节 ROS 产生,在 3 个试验组中均表达上调。LRP1 是 LDL 受体家族的一员,参与脂蛋白代谢,调节细胞增殖、迁移和肌动蛋白聚合,在 3 个试验组中均表达上调。在 STRING 分析中,c-Jun 与其他已鉴定和被预测的蛋白质的联系最多,并且参与了多条信号通路,在 3 个试验组中均表达下调。Cdc42EP1 作用于 Cdc42 下游,诱导肌动蛋白丝聚合和伪足形成^[11],在 3 个试验组中均表达下调。本研究中对足细胞进行 Crk1/2 与 CrkL 单敲降及双敲降后,LRP1 表达水平明显增加,其可造成 Rho GTPase 等信号通路改变,最终导致足细胞功能紊乱。此外,1 项基于膜性肾病微阵列和蛋白质组学数据的蛋白相互作用网络分析表明,LRP1 作为一个重要的靶基因,可能参与了膜性肾病的发病^[12]。因此,Crk1/2、CrkL、LRP1 与肾脏病之间存在重要联系。

c-Jun 是一种转录因子,参与多种生物过程,包括细胞增殖、分化和凋亡,它可以形成各种各样的二聚体,识别 AP-1 位点和 cAMP 活化位点,从而调控信号转导,多种细胞外刺激对 c-Jun 的诱导主要是通过 ERK、JNK 和 p38 级联介导完成^[13]。本研究 STRING 分析发现,c-Jun 与其他已鉴定和预测的蛋白质有最多的相关连接。KEGG 分析显示,cAMP 信号通路和 PI3K-Akt 信号通路的明显富集与 c-Jun 密切相关,这一结果表明,c-Jun 在接受 Crk1/2 与 CrkL 介导的信号转导后表达下调,并通过调控其他相关蛋白,在足细胞损伤中起关键作用。

Cdc42EP1 是一种 Cdc42 结合蛋白,作用于 Cdc42 下游,诱导肌动蛋白丝装配和板状伪足的形成,Cdc42EP1 主要通过与活化的 Cdc42-GTP、RhoQ、aPKC 和 ERK2 相互作用而被调控^[14]。在颅内神经嵴细胞中,Cdc42EP1 与 CRIB 结构域相互作用,促进伪足突起。Cdc42EP1 的缺失会导致细胞形状变圆,并伴随肌动蛋白结构紊乱和黏着斑损伤^[15]。本研究的蛋白质组学分析显示,Cdc42EP1 在 Crk1/2 与 CrkL 单敲降及双敲降的足细胞中均表达下调,提示 Crk1/2 与 CrkL 的缺失可以通过抑制 Cdc42 下游的 Cdc42EP1 调节 Rho

GTPases, 诱导肌动蛋白纤维结构破坏, 进而导致细胞形态改变。

4 结 论

综上所述, 本研究采用蛋白质组学方法探究了 Crk1/2 与 CrkL 缺失引起足细胞损伤的分子机制, 为 Crk1/2 与 CrkL 在足细胞中的功能研究提供了新思路。本研究中, Crk1/2 与 CrkL 单敲降及双敲降的足细胞与正常足细胞相比共有 98 个差异蛋白, 其中大部分蛋白与信号转导和代谢过程相关。此外, 5 个关键蛋白: TPM4、SOD2、LRP1、c-Jun 和 Cdc42EP1 已进行 Western blot 试验验证, 证实它们在足细胞损伤过程中起关键作用, 具体调控机制还有待进一步研究。

参考文献

[1] PERICO L, CONTI S, BENIGNI A, et al. Podocyte-actin dynamics in health and disease [J]. Nat Rev Nephrol, 2016, 12(11): 692-710.

[2] FOGO A B. Causes and pathogenesis of focal segmental glomerulosclerosis [J]. Nat Rev Nephrol, 2015, 11(2): 76-87.

[3] OTAKI Y, MIYAUCHI N, HIGA M, et al. Dissociation of NEPH1 from nephrin is involved in development of a rat model of focal segmental glomerulosclerosis[J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2008, 295(5): 1376-1387.

[4] KUMAR S, FAJARDO J E, BIRGE R B, et al. Crk at the quarter century mark: perspectives in signaling and cancer [J]. J Cell Biochem, 2014, 115(5): 819-825.

[5] GEORGE B, FAN Q, DLUGOS C P, et al. Crk1/2 and Crkl form a hetero-oligomer and functionally complement each other during podocyte morphogenesis[J]. Kidney Int, 2014, 85(6): 1382-1394.

[6] GEORGE B, VERMA R, SOOFI A A, et al. Crk1/2-dependent signaling is necessary for podocyte foot process spreading in mouse models of glomerular disease[J]. J Clin In-

vest, 2012, 122(2): 674-692.

[7] KAWAKAMI T, GOMEZ I G, REN S, et al. Deficient autophagy results in mitochondrial dysfunction and FSGS[J]. J Am Soc Nephrol, 2015, 26(5): 1040-1052.

[8] HABIG K, GELLHAAR S, HEIM B, et al. LRRK2 guides the actin cytoskeleton at growth cones together with ARH-GEF7 and Tropomyosin 4[J]. Biochim Biophys Acta, 2013, 1832(12): 2352-2367.

[9] MAO N, CHENG Y, SHI X L, et al. Ginsenoside Rg1 protects mouse podocytes from aldosterone-induced injury in vitro[J]. Acta Pharmacol Sin, 2014, 35(4): 513-522.

[10] BUELLI S, PERICO L, GALBUSERA M, et al. Mitochondrial-dependent autoimmunity in membranous nephropathy of IgG4-related disease [J]. EBioMedicine, 2015, 2(5): 456-466.

[11] MANTUANO E, JO M, GONIAS S L, et al. Low density lipoprotein receptor-related protein (LRP1) regulates Rac1 and RhoA reciprocally to control Schwann cell adhesion and migration[J]. J Biol Chem, 2010, 285(19): 14259-14266.

[12] TAHERKHANI A, KALANTARI S, NAFAR M. Prediction of molecular signature, potential biomarkers, and molecular pathways associated with membranous nephropathy based on protein protein interactions[J]. Rev Invest Clin, 2018, 70(4): 184-191.

[13] SHAULIAN E, KARIN M. AP-1 as a regulator of cell life and death [J]. Nature Cell Biol, 2002, 4(5): 131-136.

[14] FARRUGIA A J, CALVO F. The borg family of Cdc42 effector proteins Cdc42EP1-5 [J]. Biochem Soc Trans, 2016, 44(6): 1709-1716.

[15] COHEN S, KOVARI D T, WEI W, et al. Cdc42 regulates the cellular localization of Cdc42ep1 in controlling neural crest cell migration[J]. J Mol Cell Biol, 2018, 10(5): 376-387.

(收稿日期: 2020-02-09 修回日期: 2020-06-18)

(上接第 2579 页)

技术与软件工程, 2019, 26(5): 228-229.

[9] BAKER W S, ALBRIGHT K J, SPRATT H, et al. Data documenting the performance of the PT/INR line correction method for reconciling INR discrepancies between central laboratory coagulation analyzers using different thromboplastins during the evaluation of a portable Coagulometer[J]. Data Brief, 2017, 16: 312-320.

[10] THUERLEMANN C, HAEBERLI A, ALBERIO L. Monitoring thrombin generation by electrochemistry: development of an amperometric biosensor screening test

for plasma and whole blood[J]. Clin Chem, 2009, 55(3): 505-512.

[11] 王嵘冰, 徐红艳, 李波. BP 神经网络隐含层节点数确定方法研究[J]. 计算机技术与发展, 2018, 28(4): 31-35.

[12] 何梦乙, 覃仁超, 刘建兰. 基于 Adam-BDNN 的网络入侵检测模型[J]. 计算机测量与控制, 2020, 28(2): 58-62.

[13] 蒋昂波, 王维维. ReLU 激活函数优化研究[J]. 传感器与微系统, 2018, 37(2): 50-52.

(收稿日期: 2020-02-21 修回日期: 2020-06-20)