

免疫共沉淀筛选牛卵泡 CART 相互作用蛋白的研究

李鹏飞¹, 孟金柱², 刘岩², 黄洋², 陈建伟², 姜晓龙², 曹霞², 姚晓磊², 赵妙妙², 吕丽华^{2*}

(1. 山西农业大学生命科学学院, 太谷 030801; 2. 山西农业大学动物科技学院, 太谷 030801)

摘要: 旨在研究牛卵泡发育过程中可卡因-苯丙胺调节转录肽(Cocaine-and amphetamine-regulated transcript, CART)相互作用蛋白(Protein-protein interaction, PPI)。选择 4 头 10 月龄同期发情的健康母牛, B 超检测卵泡达 8~12 mm, 屠宰并采集、分离卵泡颗粒细胞(Granulosa cells, GCs)后, 进行总蛋白提取, 兔抗 CART 一抗沉淀 CART 及其相互作用蛋白, 经 Protein G-Agarose 磁珠吸附分离, 多次洗涤去除盐分和杂蛋白, 洗脱蛋白复合体并酶解, LC-ESI-Q-TOF 质谱分析(Mass spectrometry, MS)及数据库比对。结果显示: 共鉴定蛋白质组分 111 个; 经 Cytoscape V3.1.0 分析, 有 81 个蛋白符合功能模块, 并构建蛋白相互作用网络图; 同时对相互作用蛋白进行功能富集性分析, 共分为 3 大类 34 组: 其中分子功能占 11.73%, 生物学过程占 46.93%, 细胞组分占 41.34%。 $\alpha 2$ 巨球蛋白(A2M)和波形蛋白(VIM)与 CART 相互作用的相关系数最大; CART 与 NALP1、SERPINH1 和 PDIA6 具有负调控应答的功能, 提示可能参与牛卵泡发育过程的调控。

关键词: 牛; CART; 免疫共沉淀; 质谱分析; 相互作用

中图分类号: S823.2

文献标志码: A

文章编号: 0366-6964(2015)12-2169-07

Screening Proteins Interacting with Cocaine-and Amphetamine-Regulated Transcript in Bovine Follicles by Co-immunoprecipitation

LI Peng-fei¹, MENG Jin-zhu², LIU Yan², HUANG Yang², CHEN Jian-wei², JIANG Xiao-long², CAO Xia², YAO Xiao-lei², ZHAO Miao-miao², LÜ Li-hua^{2*}

(1. College of Life Science, Shanxi Agricultural University, Taigu 030801, China; 2. College of Animal Science and Veterinary Medicine, Shanxi Agricultural University, Taigu 030801, China)

Abstract: The study is focused on screening the proteins interacting with cocaine-and amphetamine-regulated transcript (CART) during follicle development in bovine. Four 10-month-old healthy cows, treated for estrus synchronization, were monitored by B-ultrasonic machine to find the ovarian follicles with the diameter of 8-12 mm, which were collected followed by cows being slaughtered. The granulosa cells (GCs) were isolated from those ovarian follicles and then total protein was extracted. CART and the binding protein were deposited by primary antibodies (Rabbit anti CART) using Protein G-Agarose magnetic beads, followed by salt and miscellaneous protein being removed by washing repeatedly. Protein complexes was analyzed by LC-ESI-Q-TOF mass spectrometry (MS) and alignment followed by being eluted and digested by trypsin. Results showed that 111 proteins were identified, in which 81 proteins were functional in conformity with the interaction network modules by Cytoscape V3.1.0 analysis. For the function enrichment analysis, those 81 proteins were classified into 34 groups in 3 categories: molecular function

收稿日期: 2015-03-26

基金项目: 国家自然科学基金(31172211); 农业部 948 项目(2010-Z43); 山西省横向协作与委托项目(2010HX54); 山西省回国留学人员科研资助项目(2014-重点 5); 山西省科技攻关项目(20130311027-2); 山西省人事厅人才引进项目; 山西农业大学引进人才博士科研启动费(2014ZZ04); 科研管理费资助重大项目和标志性成果培育项目(71060003)

作者简介: 李鹏飞(1978-), 男, 山西偏关人, 博士, 副教授, 主要从事动物生殖生理方面的研究, E-mail: adamlpf@126.com

* 通信作者: 吕丽华, E-mail: lihualvsxau@126.com

(11.73%), biological processes(46.93%), cell component(41.34%). The correlation coefficient of the interaction between A2M, VIM and CART was maximum. It was also found CART was negatively regulated by NALP1, SERPINH1 and PDIA6, which suggested that they might participate in regulating follicle development in bovine.

Key words: bovine; CART; co-immunoprecipitation; mass spectrometry; interaction

在人和多种动物组织内, CART 已被成功克隆并测序, 其均由 2 个内含子和 3 个外显子构成。蛋白序列 C 端有 3 对二硫键维持空间结构并保证 CART 活性, N 端构象缺乏规律性。本课题组在前期研究中, 通过卵泡 GCs 体外培养研究发现, CART 对牛^[1-2]、猪^[3]、绵羊^[4] 卵泡 GCs 的生长增殖及雌激素分泌具有抑制作用, 进而对卵泡发育产生影响; 免疫组化研究也表明, CART 在牛^[5]、猪^[6]、绵羊^[7] 有腔卵泡的 GCs 和卵丘细胞层均有表达。本试验通过 Co-IP 及 MS 技术对影响牛卵泡发育的 CART 及其相互作用蛋白进行研究, 为探讨 CART 对牛卵泡发育的调控机理, 进一步明确牛卵泡发育过程及卵泡相关激素调节奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试验动物及组织 本试验牛卵泡 GCs 总蛋白提取材料来自北京大兴区金维福仁肉牛屠宰场。选取 4 头母牛(海福特杂交后代), 屠宰后采集双侧卵巢, 投入 4 °C DPBS 中, 实验室进行卵泡 GCs 分离。

1.1.2 试剂 兔抗 CART 一抗(Phoenix pharmaceuticals, 美国), Western 及 IP 细胞裂解液(Beyotime, 上海), Protein G-Agarose 磁珠、蛋白酶抑制剂(Roche, 瑞士), 酶解试剂盒(Pierce, 美国), 色谱级甲醇、乙腈、无水乙醇、甲醛、氯仿、异丙醇、正己烷等均为国产分析纯级试剂。

1.2 试验方法

1.2.1 GCs 的分离 母牛屠宰后采集双侧健康卵泡, 眼科剪剪取 8~12 mm 透明或呈黄色的卵泡, 无菌 DPBS 冲洗两次后, 刮刀刮取卵泡内膜 GCs, 并收集到表面皿的培养液中, 2 000 r·min⁻¹ 离心, 弃上清, -80 °C 保存。

1.2.2 GCs 总蛋白的提取 预冷 PBS 液将 GCs 冲洗两次, GCs 悬液转移至灭菌离心管中, 4 °C 1 000 r·min⁻¹ 离心 10 min, 弃上清; 低渗溶液重悬, 4 °C 1 000 r·min⁻¹ 离心 5 min, 弃上清; 低渗溶液重悬沉淀, 低温溶胀 35~40 min, 4 °C 3 000

r·min⁻¹ 离心 15 min, 弃上清; 加入细胞裂解液, 4 °C 孵育 30 min; 4 °C 20 000 r·min⁻¹ 离心, 上清液即为总蛋白溶液; -80 °C EP 管保存备用。

1.2.3 总蛋白浓度测定 测定蛋白溶液 280 nm/260 nm 紫外吸收值, 蛋白浓度 = 1.45 × OD_{280 nm} - 0.74 × OD_{260 nm} (mg·mL⁻¹), 即可算出蛋白溶液浓度。

1.2.4 总蛋白溶液预处理 将洗脱柱放在离心管上, 以每毫克初蛋白滴加 80 μL Control Agarose Resin 过柱; 1 000 r·min⁻¹ 离心 1 min, 弃上清; 100 μL 1 × Coupling Buffer 洗柱; 1 000 r·min⁻¹ 离心 1 min, 弃上清; 2 mg 初蛋白过柱, 4 °C 孵育 1 h; 离心分离获得预处理的总蛋白。

1.2.5 CART 一抗免疫沉淀 取等体积的总蛋白和 Lysis Buffer 及 200 μL Protein G-Agarose 磁珠于 EP 管中, 1 mL PBS 洗涤磁珠, 4 °C 3 000 r·min⁻¹ 离心 3 min, 弃上清, 重复 3 次; Lysis Buffer 清洗 1 次; 总蛋白溶液中加入 30 μL 磁珠, 3 000 r·min⁻¹ 离心 3 min; 取上清于无菌 EP 管中, 加 2 μL 稀释过的 CART 抗体, 4 °C 摇床孵育过夜; 加 50 μL 磁珠, 4 °C 摇床孵育 2~3 h; 4 °C 3 000 r·min⁻¹ 离心 3 min; 磁珠分别用 500 μL PBS 清洗 3 次, 4 °C 3 000 r·min⁻¹ 离心 3 min, 弃上清; 加 10 μL 5 × Sample Buffer 和 20 μL Lysis Buffer, -20 °C 保存备用。

1.2.6 Co-IP 复合物洗脱及酶解 将 Co-IP 磁珠转移至无菌 EP 管中, 加入 10 μL Elution Buffer 洗涤磁珠, 1 000 r·min⁻¹ 离心 1 min, 收集洗脱液; 洗脱柱中加 50 μL Elution Buffer, 室温孵育 5 min, 1 000 r·min⁻¹ 离心 1 min; 收集 2 次洗脱液, 即为 CART Co-IP 复合物, 核酸蛋白检测仪测定蛋白浓度; 0.25% 胰酶进行酶解。

1.2.7 LC-ESI-Q-TOF 质谱分析 使用 LC-ESI-Q-TOF 质谱分析仪, 首先液相色谱(Liquid Chromatogram, LC)分离肽段, 纳流泵流速设定为 0.3 μL·min⁻¹; 溶剂 A(0.1% 甲酸 + 98.9% ddH₂O + 1% 乙腈) 装入 HPLC-Chip 富集柱 1.5 min 后反冲, RP 分析柱梯度洗脱; 毛细管泵流动相为 99% ddH₂O + 1% 乙腈, 流速 4.0 μL·min⁻¹。

正离子模式下进行蛋白组分析,获取的 MS/MS 经 MassLynx 软件转化为 PKL 文件。MASCOT v2.2 软件(www.matrixscience.com)进行数据库搜索,参数设定:IPI(The international protein index) Mammalia database(Http://www.ncbi.nlm.nih.gov/);固定修饰选择 Carbamoylmethylation(C),可变修饰为 Oxidation(M),Trypsin 切割,允许最大未酶切位点数为 1,肽段质量容差(Peptide Mass Tolerance)为 $\pm 50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$,碎片离子质量容差(Fragment Mass Tolerance)为 $\pm 0.05 \text{ u}$;肽段评分超过阈值^[8]视为鉴定肽段,置信度大于 95%。

1.2.8 CART 相互作用蛋白分析 通过 Cytoscape V3.1.0(插件 ClusterViz V3.1.0)导入模块,选择 Wikipathways、Reactome、GeneOntology、KEGG Pathway 分析计算,并构建蛋白网络图谱。

1.2.9 功能富集性分析 通过 Cytoscape V3.1.0 对 CART 相互作用蛋白进行基因功能富集性分析,选择牛基因组数据库,超几何分布检验及本杰明-哈氏假阳性率(False discovery rate, FDR)校正,设定参数 $P < 0.05$ 。

2 结果

2.1 GCs 总蛋白提取及定量

经测定总蛋白浓度为 $1.78 \mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$,样品可用于 Co-IP。

2.2 LC-ESI-Q-TOF 质谱鉴定

胰酶酶解的多肽混合溶液经 LC 分离,质谱仪检测结果显示:一级质谱(MS)检测获得 2 522 个多肽信息,这些多肽经碰撞诱导解离(CID)获得 7 018 个碎片离子信息。

图 1 为左侧的诱饵库与右侧的目标库构成混合

数据库,随着峰值肽得分增加,肽段频谱匹配(PSM)数呈下降趋势(图 1a);随着峰值肽得分的增加,假阳性率明显降低,母离子质量误差集中在 $10 \sim 30 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$,混合数据库分界——峰值肽得分($-10\lg P$)控制在 ≥ 23.4 (图 1b);图 2 为从头测序(De Novo)肽段置信度分布,图 2a 诱饵库与目标库重合面积较图 2b 要小,与目标库频谱匹配肽段非重合区置信度均在 50% 以上;图 2b 为 De Novo 肽段数据库赋值置信度分布,非重合区置信度均在 79% 以上。结果分析参考 B. M. Balgley 等^[9]的方法,将 FDR 为 1.0% 时对应的 E 值作为阈值来筛选 Mascot 搜索结果,最终确定肽段频谱与数据库匹配数为 2 566 个(表 1)。

蛋白搜索使用 Mascot v2.2 搜索引擎,以 NCBI nr 数据库(35 149 712 sequences;12 374 887 350 residues)中哺乳动物(Mammalia,2 144 738 sequences)数据库为基础,设定匹配评分 ≥ 20 ,单肽段匹配数 ≥ 1 ,匹配置信度 $\geq 50\%$;显著性阈值(Significance threshold) $P < 0.05$ 。结果显示,在 2 566 条频谱匹配肽段中,对应蛋白质组分 111 个(表 1)。

表 1 筛选结果统计

Table 1 Statistics of filtered result

项目 Filtered item	结果 Result
Peptide-spectrum matches	2 566
Peptide sequences	489
Protein groups	111
Proteins	645
Proteins(# Unique Peptides)	140(>2);83(=2);422(=1)
FDR(Peptide-spectrum matches)	1.0%
FDR(Peptide sequences)	4.1%
FDR(Protein)	0.0%
De novo only spectra	1 109

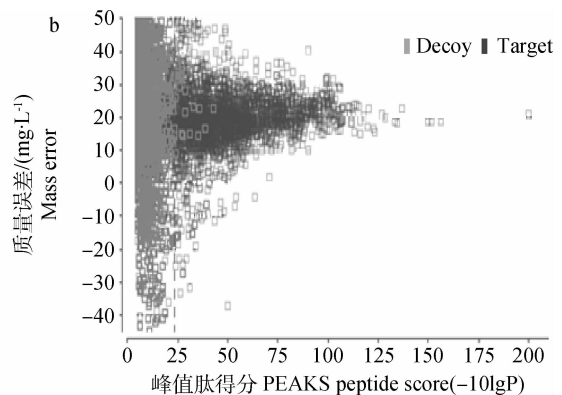
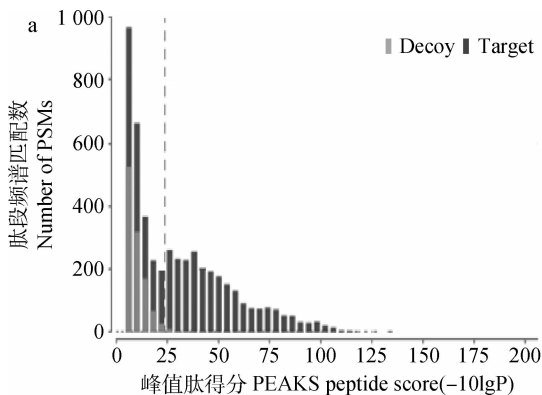


图 1 肽段频谱匹配(PSM)得分分布

Fig. 1 Peptide-spectrum matches(PSM) score distribution

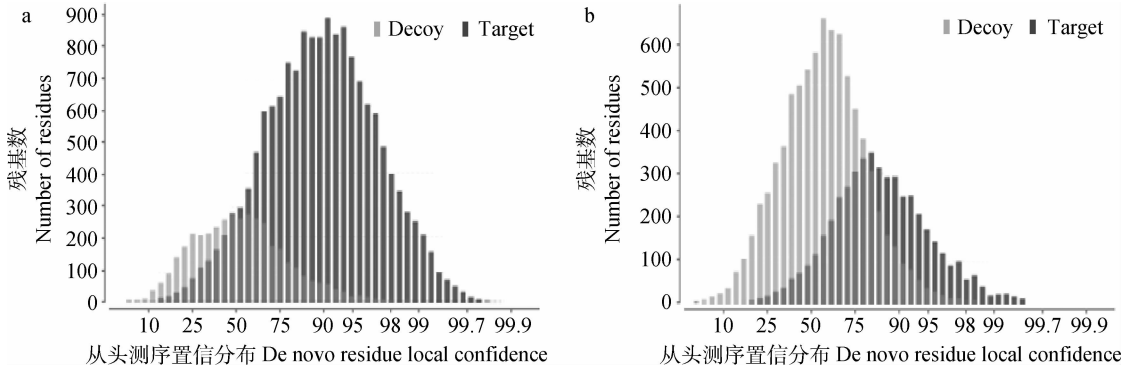


图 2 从头测序结果确认——肽段置信分布
 Fig. 2 De novo result validation. Distribution of residue local confidence

2.3 CART 相互作用蛋白网络构建

经 Cytoscape V3. 1. 0(插件 ClusterViz V3. 1. 0) 导入 111 个蛋白组分, 其中有 81 个功能模块符合构

建 CART 相互作用网络图谱(图 3)。结果表明, $\alpha 2$ 巨球蛋白(A2M)和波形蛋白(VIM)与 CART 相互作用的相关系数最大。

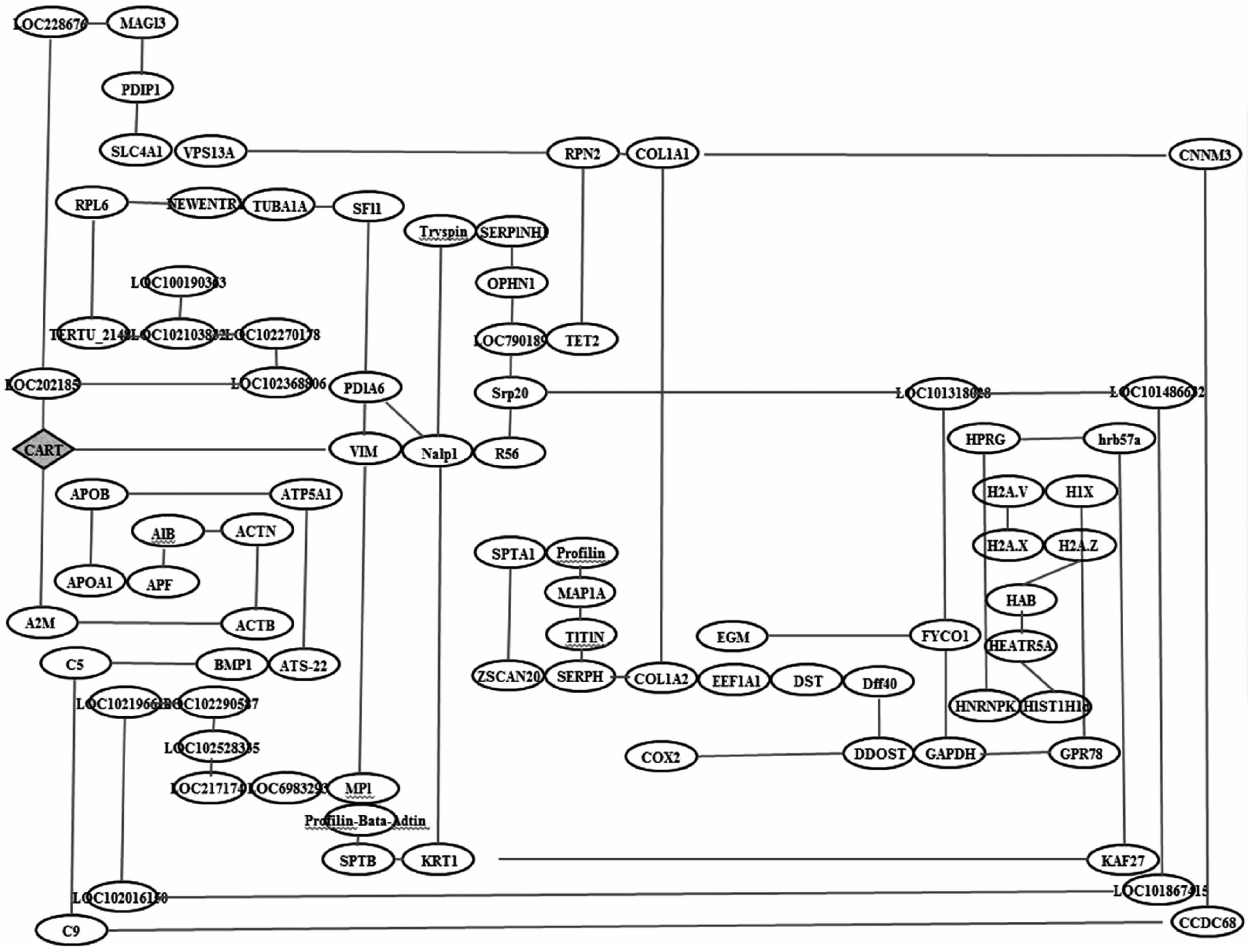


图 3 CART 相互作用蛋白网络图
 Fig. 3 Protein interaction network diagram on CART

2.4 蛋白功能富集性分析

经 Cytoscape V3.1.0 导入 111 个蛋白组分对应的基因,进行基因功能富集性分析,结果见图 4,共分为 3 大类 34 组:其中分子功能占 11.73%,生物学过程占 46.93%,细胞组分占 41.34%。在卵泡发育过程中,CART 主要抑制卵泡 GCs 的增殖及

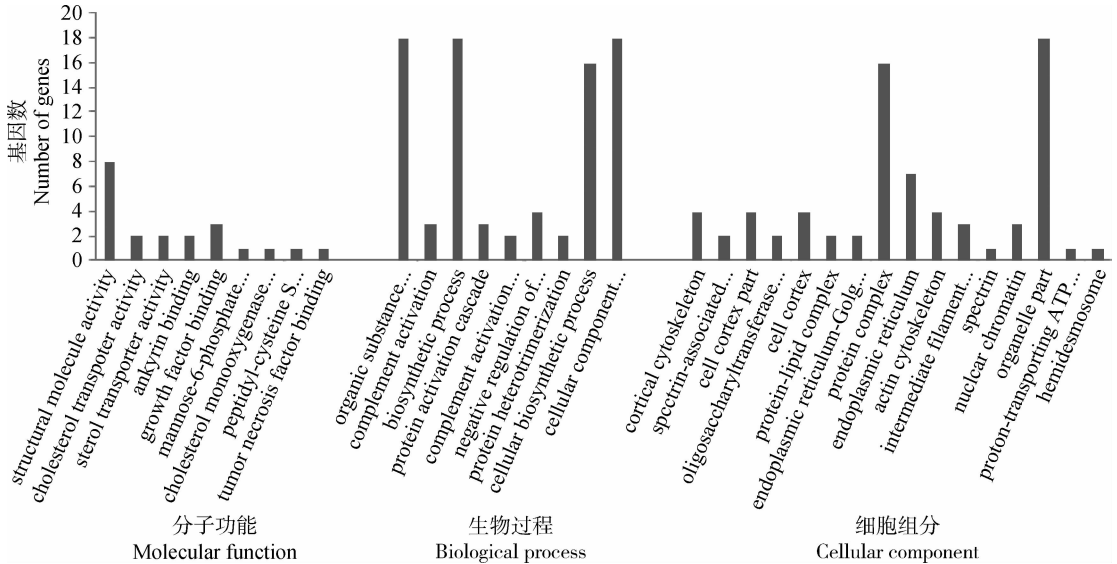


图 4 CART 相互作用网络图

Fig. 4 Protein interaction network diagram on CART

3 讨论

蛋白质组学从蛋白质整体作用关系来研究生物有机体^[10-11],而 PPI 作为细胞调节和信号传导的基本要素,对蛋白功能的实现发挥决定作用^[12-13]。陈娟^[14]应用细菌双杂交技术对 CART 的 PPI 做过研究。在本试验中,采用 Co-IP 技术获得 CART 蛋白复合物,经酶解及质谱分析对 CART 的 PPI 进行研究,Protein G 琼脂糖磁珠 Co-IP 是利用细菌蛋白的“Protein G”作为抗原特异性结合抗体的 Fc 区段的原理而开发的方法;试验过程中涉及到抗体及总蛋白的纯度、抗体-Agarose beads 的特异性结合、复合物洗涤效果及质谱分析结果的鉴定,均会影响到研究结果的准确性。

由相互作用蛋白网络图可知,A2M 和 VIM 与 CART 的相关系数最大。A2M 基因全长 4 900 bp,定位于牛第 5 号染色体,为 α -巨球蛋白家族的一员,在动物体内通过对内外源蛋白酶活性的调节来执行其生理功能^[15]。VIM(Vimentin)为波形蛋白,在间质组织广泛表达,对细胞完整性的维持及细胞应激

E₂ 的分泌,从而发挥其负调控的功能,功能富集性分析结果显示,CART 与 NALP1、SERPINH1 和 PDIA6 的负调控应答(Negative regulation of response)功能提示,这些基因或蛋白可能对卵泡的发育产生重要影响。

反应的产生具有重要作用^[16];研究也表明,在许多疾病尤其是一些恶性肿瘤发生过程中,均有 VIM 的异常表达,造成癌细胞的生长、迁移加速,预后效果较差^[17]。仅通过功能及相关系数还不能确定三者的关系,还有待进一步研究。

通过对 CART 相互作用蛋白的功能富集性分析表明,CART 与 NALP1、SERPINH1、PDIA6 具有负调控应答的功能,可能通过启动 GCs 凋亡程序进而影响了卵泡的正常发育。NALP1 为 NOD 样受体超家族蛋白,在动物体内诱导细胞凋亡体的形成;整个过程中,caspase-2、caspase-3 和 caspase-9 通过与 NALP1 相互作用,进一步加速凋亡体的形成。F. Liu 等^[18]在 HELA 细胞体外培养研究中证实,NALP1 通过诱导激活 caspase-3 促进 HELA 细胞的凋亡;C. F. Frederick Lo 等^[19]通过基因重组技术瞬时表达重组 NALP1 的神经元发现,该神经元细胞诱导 caspase-3 活化并促进细胞凋亡,表明 NALP1 在受损神经元内可能参与细胞凋亡蛋白酶活化的调节。SERPINH1 属于丝氨酸蛋白酶抑制剂家族蛋白,通过对该蛋白功能的研究发现:SER-

PINH1 与肿瘤细胞的生长和成骨不全症的形成有关。在人和小鼠体内 SERPINH1 基因发生变异,可导致蛋白装配、折叠和分泌过程异常,导致胎儿发育受阻及骨骼形成异常^[20-22];Y. Y. Yu 等^[23]应用 siRNA 干扰技术研究发现,SERPINH1 基因沉默后对模型小鼠的肿瘤生长有促进作用,即SERPINH1具有肿瘤抑制作用;PDIA6 分布于内质网、高尔基体中心区域,目前,PDIA6 与细胞生长调节的相关性主要体现在肿瘤研究方面,PDIA6 通过信号通路激活及蛋白折叠反应激活,促进肿瘤的转移和侵袭^[24-25]。

为了确定 CART 的受体,前人已做了大量研究^[26-28],到目前基本明确了 CART 受体的相关特性,但受体蛋白仍未确定。本研究通过 Co-IP 技术对 CART 相互作用蛋白进行研究,为进一步确定 CART 受体奠定基础。

4 结 论

本研究经 Co-IP 及质谱分析共获得 111 个 CART 相互作用蛋白并构建 CART 相互作用蛋白网络,其中 CART 与 A2M 和 VIM 的相关系数最大;功能富集性分析发现:CART 与 NALP1、SERPINH1 和 PDIA6 具有负调控应答的功能,提示可能参与牛卵泡发育过程的调控。

参考文献(References):

- [1] SEN A, LÜ L H, BELLO N, et al. Cocaine-and amphetamine-regulated transcript accelerates termination of follicle-stimulating hormone-induced extracellularly regulated kinase 1/2 and Akt activation by regulating the expression and degradation of specific mitogen-activated protein kinase phosphatases in bovine granulosa cells [J]. *Mol Endocrinol*, 2008, 22 (12): 2655-2676.
- [2] LÜ L H, JIMENEZ-KRASSEL F, SEN A, et al. Evidence supporting a role for cocaine-and amphetamine-regulated transcript(CARTPT) in control of granulosa cell estradiol production associated with dominant follicle selection in cattle[J]. *Biol Reprod*, 2009, 81 (3): 580-586.
- [3] 李鹏飞, 岳文斌, 李富禄, 等. 可卡因-苯丙胺调控转录肽(CART)对猪卵巢卵泡颗粒细胞雌激素产生的影响[J]. 畜牧兽医学报, 2012, 43(12): 1879-1886.
- LI P F, YUE W B, LI F L, et al. Effects of CART on

estradiol production of pig ovarian follicular granulosa cells *in vitro* culture[J]. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 2012, 43(12): 1879-1886. (in Chinese)

- [4] 李鹏飞, 岳文斌, 黄 洋, 等. 可卡因-苯丙胺调控转录肽对绵羊卵巢卵泡颗粒细胞雌激素产生的影响[J]. 畜牧兽医学报, 2013, 44(6): 853-857.
- LI P F, YUE W B, HUANG Y, et al. Effects of CART on estradiol production *in vitro* in follicular granulosa cells of sheep ovarian[J]. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 2013, 44(6): 853-857. (in Chinese)
- [5] KOBAYASHI Y, JIMENEZ-KRASSEL F, LI Q, et al. Evidence that cocaine-and amphetamine-regulated transcript is a novel intraovarian regulator of follicular atresia[J]. *Endocrinology*, 2004, 145(11): 5373-5383.
- [6] 孙晋艳. 不同大小猪卵泡颗粒细胞 CART mRNA 表达与卵泡液雌激素浓度的关系及猪卵泡颗粒细胞体外培养体系的优化[D]. 太谷: 山西农业大学, 2012.
- SUN J Y. Study on the relationship between CART mRNA expression in pig follicular granulosa cells in different sizes and estradiol concentrations in follicular fluid & optimization of *in vitro* culture system of pig granulosa cells [D]. Taigu: Shanxi Agricultural University, 2012. (in Chinese)
- [7] 庞钰英. 绵羊卵泡 CART 蛋白表达及其在颗粒细胞体外培养中的作用[D]. 太谷: 山西农业大学, 2013.
- PANG Y Y. Expression of CART protein in sheep ovarian follicles and functions on follicular granulosa cells *in vitro* culture [D]. Taigu: Shanxi Agricultural University, 2013. (in Chinese)
- [8] ZHANG L, XIE J, WANG X, et al. Proteomic analysis of mouse liver plasma membrane: use of differential extraction to enrich hydrophobic membrane proteins [J]. *Proteomics*, 2005, 5(17): 4510-4524.
- [9] BALGLEY B M, LAUDEMAN T, YANG L, et al. Comparative evaluation of tandem MS search algorithms using a target-decoy search strategy [J]. *Mol Cell Proteomics*, 2007, 6(9): 1599-1608.
- [10] BADER G D, HEILBUT A, ANDRENS B, et al. Functional genomics and proteomics: Charting a multidimensional map of the yeast cell [J]. *Trends Cell Biol*, 2003, 13(7): 344-356.
- [11] MORITZ R L, JI H, SCHÜTZ F, et al. A proteome strategy for fractionating proteins and peptides using continuous free-flow electrophoresis coupled off-line to reversed-phase high-performance liquid chromatography [J]. *Anal Chem*, 2004, 76(16): 4811-4824.

- [12] WALHOUT A J, VIDAL M. Protein interaction maps for model organisms [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2001, 2(1):55-62.
- [13] CHEN Z, HAN M. Building a protein interaction map: research in the post-genome era [J]. *Bioessays*, 2000, 22(6):503-506.
- [14] 陈娟, 赵瑛, 由振东. 可卡因苯丙胺调节转录肽相互作用蛋白的筛选 [J]. *基础医学与临床*, 2007, 27(1):25-30.
- CHEN J, ZHAO Y, YOU Z D. Screening of proteins interacting with neuropeptide CART [J]. *Basic & Clinical Medicine*, 2007, 27(1):25-30. (in Chinese)
- [15] GAETANO J S, SHAWN R B, CAROLINA C, et al. Poster 8 hondroprotective effect of alpha-2-macroglobulin (A2M) on bovine cartilage explants [J]. *PM&R*, 2012, 4(10):S191.
- [16] CLARKE E J, ALLAN V. Intermediate filaments: vimentin moves in [J]. *Curr Biol*, 2002, 12(17):596-598.
- [17] SATELLI A, LI S. Vimentin in cancer and its potential as a molecular target for cancer therapy [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2011, 68(18):3033-3046.
- [18] LIU F, LO C F, NING X, et al. Expression of NALP1 in cerebellar granule neurons stimulates apoptosis [J]. *Cell Signal*, 2004, 16(9):1013-1021.
- [19] FREDERICK LO C F, NING X P, GONZALES C, et al. Induced expression of death domain genes NALP1 and NALP5 following neuronal injury [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2008, 366(3):664-669.
- [20] CHRISTIANSEN H E, SCHWARZE U, PYOTT S M, et al. Homozygosity for a missense mutation in SERPINH1, which encodes the collagen chaperone protein HSP47, results in severe recessive osteogenesis imperfecta [J]. *Am J Hum Genet*, 2010, 86(3):389-398.
- [21] WIDMER C, GEBAUER J M, BRUNSTEIN E, et al. Molecular basis for the action of the collagen-specific chaperone Hsp47/SERPINH1 and its structure-specific client recognition [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2012, 109(33):13243-13247.
- [22] EYRE D R, WEIS M A. Bone collagen: new clues to its mineralization mechanism from recessive osteogenesis imperfecta [J]. *Calcif Tissue Int*, 2013, 93(4):338-347.
- [23] YU Y Y, ZENG B, CHAI L M, et al. Effect of serpinH1 on proliferation and growth of murine tumor [J]. *Cancer Res Treat*, 2009, 36(9):741-744.
- [24] TUFO G, JONES A W, WANG Z, et al. The protein disulfide isomerases PDIA4 and PDIA6 mediate resistance to cisplatin-induced cell death in lung adenocarcinoma [J]. *Cell Death Differ*, 2014, 21(5):685-695.
- [25] GROENENDYK J, PENG Z, DUDEK E, et al. Interplay between the oxidoreductase PDIA6 and microRNA-322 controls the response to disrupted endoplasmic reticulum calcium homeostasis [J]. *Sci Signal*, 2014, 7(329):ra54.
- [26] VICENTIC A, LAKATOS A, KUCHAR M J. CART (cocaine-and amphetamine-regulated transcript) peptide receptors: specific binding in AtT20 cells [J]. *Eur J Pharmacol*, 2005, 528(1-3):188-189.
- [27] KELLER P A, COMPAN V, BOCKAERT J, et al. Characterization and localization of cocaine-and amphetamine-regulated transcript (CART) binding sites [J]. *Peptides*, 2006, 27(6):1328-1334.
- [28] MALETÍNSKÁ L, MAIXNEROVÁ J, MATYSKOVÁ R, et al. Cocaine-and amphetamine-regulated transcript (CART) peptide specific binding in pheochromocytoma cells PC12 [J]. *Eur J Pharmacol*, 2007, 559(2-3):109-114.

(编辑 程金华)