

NCAPD3 激活 AKT-FOXO 信号通路 抑制前列腺癌细胞的凋亡

贺稳政, 吴庆新, 刘 平

(南京师范大学生命科学学院, 生物化学与生物制品研究所, 江苏 南京 210023)

[摘要] NCAPD3(non-SMC condensin II complex subunit D3)是 condensin II 复合物的亚基,其在细胞中的主要功能是调控有丝分裂时期染色质的凝缩和稳定,在前列腺癌中 NCAPD3 还发挥促癌的作用. 本研究探讨 NCAPD3 促进前列腺癌发生发展的分子机制. 首先,利用数据库分析 NCAPD3 在不同癌症的表达差异,再选取前列腺正常细胞和多种前列腺癌细胞为实验材料,检测 p-AKT 和 NCAPD3 的表达. 其次,分别在 LNCaP 中用 siRNA 敲低 NCAPD3 和 DU145 中过表达 NCAPD3,Western blot 检测 AKT(Thr308 和 Ser473)的磷酸化水平,FOXO1/3A 以及下游凋亡相关因子的表达水平,辅以流式细胞仪检测前列腺癌细胞凋亡情况. 结果表明,NCAPD3 在前列腺癌中高表达,NCAPD3 通过磷酸化激活 AKT,进而调控 FOXO1 和 FOXO3A 的转录活性,抑制前列腺癌细胞发生凋亡作用,有利于癌细胞的生长;最终导致前列腺癌的恶性进展. 本研究发现 NCAPD3 在前列腺癌中作为促癌基因,可能成为前列腺癌的一个新的临床诊断和治疗的靶基因.

[关键词] 前列腺癌,细胞凋亡,NCAPD3,AKT,FOXO1/3A

[中图分类号]R36 **[文献标志码]**A **[文章编号]**1001-4616(2021)03-0090-06

NCAPD3 Inhibits Apoptosis of Prostate Cancer Cells by Activating AKT-FOXO Signaling Pathway

He Wenzheng, Wu Qingxin, Liu Ping

(School of Life Sciences, Nanjing Normal University, Institute of Biochemistry and Biological Products, Nanjing 210023, China)

Abstract: NCAPD3(non SMC condensin II complex subunit D3)is a subunit of condensin II complex. Its main function in cells is to regulate the condensation and stabilization of chromatin during mitosis. NCAPD3 also plays a role in promoting cancer in prostate cancer. This study was to explore the molecular mechanism of NCAPD3 in promoting the development of prostate cancer. Firstly,the expression of NCAPD3 in different cancers was analyzed by using the database,and then the expression of p-AKT and NCAPD3 in normal prostate cells and various prostate cancer cells were detected. Secondly, siRNA was used to knock down NCAPD3 in LNCaP and overexpression of NCAPD3 in DU145. Western blot was used to detect the phosphorylation level of AKT(Thr308 and Ser473),the expression level of FOXO1/3A and downstream apoptosis related factors,and flow cytometry was used to detect the apoptosis of prostate cancer cells. The results showed that NCAPD3 was highly expressed in prostate cancer. NCAPD3 activated AKT through phosphorylation,and then regulated the transcriptional activities of FOXO1 and FOXO3A,inhibited the apoptosis of prostate cancer cells,and was beneficial to the growth of prostate cancer cells,eventually lead to the malignant progression of prostate cancer. This study found that NCAPD3,as a tumor promoting gene in prostate cancer,may become a new target gene for clinical diagnosis and treatment of prostate cancer.

Key words: prostate cancer,apoptosis,NCAPD3,AKT,FOXO1/3A

前列腺癌(PCa)在世界范围内是仅次于肺癌的第二大最常见的男性癌症,是癌症死亡的主要原因之一^[1]. PCa 是一种常见的疾病,平均每七个北美男性中就有一人会受到前列腺癌症的影响^[2]. 随着预期寿命的增加,老年前列腺癌患者的数量逐年增加^[3]. 近年来,尽管前列腺癌的基础研究和临床应用水平不断

收稿日期:2020-03-18.

基金项目:国家自然科学基金项目(81272850,81472415).

通讯作者:刘平,博士,教授,研究方向:前列腺癌表观遗传学. E-mail:liuping0805@njnu.edu.cn

提高,但前列腺癌的治疗效果仍不理想。

凝缩蛋白(condensin)复合物在细胞中的主要功能是调控有丝分裂时期染色质的凝缩和稳定^[4]。凝缩蛋白复合物以 SMC(structural maintenance of chromosomes)为核心亚单位显示出高度特征性的棒状结构,并通过主动机制组织大规模的染色体组装^[5]。凝缩蛋白复合物对于生命的正常繁衍必不可少^[6]。大多数真核生物有两种凝缩蛋白复合物:凝缩蛋白复合物 I 和 II。NCAPD3(non-SMC condensin II complex subunit D3)是 condensin II 的亚基,在真核细胞有丝分裂过程中起关键作用^[7]。当 NCAPD3 功能异常时,染色体结构会发生异常,导致有丝分裂细胞异常^[8]。而 NCAPD3 的突变会引起小头症,说明有丝分裂染色体浓缩是确保哺乳动物大脑皮层大小的关键过程^[9]。有研究表明 NCAPD3 可能通过激活 IKK/NF- κ B 通路刺激炎症因子 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 的分泌,从而促进炎症的进展^[8]。在胰腺导管腺癌中,NCAPD3 可以作为一个新的预后预测因子^[10]。

丝氨酸/苏氨酸激酶 AKT,也称为蛋白激酶 B(PKB),作为 PI3K 的直接下游靶标,AKT 在细胞增殖、分化、凋亡及迁移中充当重要的角色。AKT 的典型底物之一是 FOXO 转录因子家族的 FOXO1 和 FOXO3A。FOXOs 作为转录因子,主要在核中调控凋亡相关因子的表达,如 FasL、Bim 等。FasL 引发外源性途径的细胞凋亡,而 Bim 引发线粒体依赖性途径的细胞凋亡^[11]。AKT 磷酸化 FOXOs 的丝氨酸/苏氨酸残基,如 FOXO1 的 Ser256 位点、FOXO3A 的 Ser253 位点^[12],磷酸化的 FOXOs 与伴侣蛋白 14-3-3 结合,从细胞核转移到细胞质且失去转录活性^[13]。此外,AKT 还通过调控 FOXOs 影响细胞的诸多功能,包括细胞分化、细胞增殖、DNA 损伤和修复及氧化应激等。

本实验室前期实验结果发现,NCAPD3 在前列腺癌的发展中发挥促癌的作用。但是,NCAPD3 在前列腺癌中发挥功能的分子机制尚未见报道。本实验 NCAPD3 在前列腺癌中作为一种促癌因子抑制细胞凋亡的机制,为前列腺癌分子病因学的进一步完善提供实验依据,也为未来治疗前列腺癌提供新的药物靶点。

1 材料和方法

1.1 实验材料

NCAPD3 表达质粒(pcDNA3.1/NCAPD3)由本实验室构建并保存;小干扰 RNA(siNCAPD3)购自通用生物;DNA Marker 购自上海捷瑞生物公司;蛋白质 Marker 购自赛默飞公司;ECL 试剂购自 Tanon 公司;细胞凋亡试剂盒购自凯基生物;质粒小提试剂盒购自天根生物有限公司;FOXO1、p-FOXO3A(S253)、FasL 抗体均购自 Affinity 公司;p-AKT(S473)抗体购自 CST 公司;NCAPD3、AKT、p-FOXO1(S256)、FOXO3A、BCL-2 抗体均购自 Proteintech 公司; β -actin、p-AKT(T308)抗体均购自 ABclonal 公司;胰蛋白酶、RIPA 裂解液均购自碧云天生物技术有限公司;RPMI 1640 培养基购自维森特生物技术有限公司;胎牛血清购自美国 Gibco 公司;胰蛋白酶(Trypsin)购自 Biosharp 生物科技公司;Lipofectamine[®] 2000 转染试剂购自美国 Invitrogen 公司;实验所用细胞正常前列腺基质细胞 WPMY-1、前列腺增生细胞 BPH-1、前列腺癌细胞 PC-3、DU145、CWR22RV1 和 LNCaP 购自中国科学院上海细胞库。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养及细胞传代

正常前列腺基质细胞 WPMY-1、前列腺增生细胞 BPH-1、前列腺癌细胞 PC-3、DU145、CWR22RV1 和 LNCaP。使用 RPMI 1640 完全培养基,37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 恒温培养箱中进行培养。培养适当时间后显微镜下观察细胞形态和密度,确定细胞生长状况,待细胞密度生长至 80%左右,用 0.25%的胰蛋白酶消化,按合适比例进行细胞传代。

1.2.2 细胞转染

细胞密度长至 80%后胰酶消化细胞,进行细胞计数、铺板,待细胞密度达到 60%~70%时进行转染,使用无血清培养基分别按一定比例稀释实验相关质粒 DNA 或 siRNA,混匀后,将 lipofectamine[®] 2000 试剂加入到质粒 DNA 或 siRNA 稀释液中,再次混匀后,室温静置 15 min~20 min。然后在转染细胞中加入相应体积无血清培养基,将转染复合物加至细胞培养基中孵育 4 h~6 h 后更换为完全培养基,继续培养 48 h。

1.2.3 细胞总 RNA 的提取

细胞转染 48 h 后,吸去旧培养基后,加入预冷的 PBS 洗 1~2 次;向培养皿中加入 400 μ L 预冷的 Trizol,在冰上静置 5 min 后,用移液枪轻轻吹打,收集至 1.5 mL RNase-free EP 管中,再次冰上静置 5 min,

按氯仿/Trizol=1:5 体积加入氯仿,涡旋振荡 30 s,充分混匀,冰上放置 3 min;随后 4 ℃ 12 000 rpm 离心 12 min,吸取含上层无色水相转移至新的 EP 管中;按异丙醇/Trizol=1:2 体积加入异丙醇,轻轻颠倒混匀,-20 ℃ 放置 1 h;4 ℃ 12 000 rpm 离心 10 min,弃上清,沉淀可见于管底;沉淀中加入 1 mL 75%乙醇溶液,上下颠倒翻转,4 ℃ 7 500 rpm 离心 5 min;弃上清,室温开盖干燥 10 min;沉淀中加入 25 μ L RNase-free ddH₂O 溶解沉淀,紫外分光光度计测定 RNA 浓度,随后置于-80 ℃ 冰箱保存。

1.2.4 细胞总蛋白提取与定量

细胞转染 48 h 后,吸去旧培养基,加入预冷的 PBS 洗 1~2 次;每孔加入新配制 120 μ L 细胞裂解液(RIPA:PMSF:磷酸酶抑制剂=9:1:0.1,V/V);静置 2 min 后将细胞刮下并将细胞裂解液收集至 1.5 mL 的离心管中,冰上静置,每隔 10 min 涡旋一次,共 40 min,使细胞充分裂解;12 000 r/min 离心 15 min,取上清;DC 法对上清样品进行总蛋白定量并将提取的细胞总蛋白、ddH₂O、5 \times loading buffer 按一定比例混匀,在 95 ℃ 的金属浴中煮样变性配制成上样液,置于-20 ℃ 冰箱中保存待用。

1.2.5 免疫印迹分析

根据蛋白定量的结果,每次上样取 20 μ g 总蛋白样品进行 SDS-PAGE 电泳,电泳结束后,将蛋白质转移至 PVDF 膜上(转膜时间根据蛋白条带大小),转膜结束后用新配制的 5%脱脂奶粉的 PBS 室温封闭 1 h;PBST 清洗 3 次后,4 ℃ 孵育一抗过夜,洗膜 3 次,室温孵育二抗 1 h;孵育结束后,PBST 清洗 3 次;取适量 ECL 试剂 A、B 液等体积混合后滴于 PVDF 膜上,进行化学发光显影拍照,并对条带进行灰度分析。

1.2.6 流式细胞术检测细胞凋亡

用不含 EDTA 的胰酶消化细胞 3 min,弃去胰酶,加入新鲜培养基轻柔吹打,并转移至 1.5 mL 离心管中;用 PBS 洗涤细胞 1~2 次(2000 rpm 离心 5 min),收集 $1\times 10^5\sim 5\times 10^5$ 细胞;细胞沉淀中加入 500 μ L 的 Binding Buffer 轻柔悬浮;加入 5 μ L Annexin V-FITC 混匀后,加入 5 μ L Propidium Iodide,混匀;室温、避光、反应 5 min~15 min 后,进行流式细胞仪的检测和观察。

1.2.7 数据库分析

利用 The-Human-Protein-Atlas(<https://www.proteinatlas.org/>)数据库的转录组学数据分析 NCAPD3 在各种癌症组织样本中的表达水平;利用 GEPIA 数据库对不同癌症以及相同癌症中相对于正常组织表达分析(<http://gepia.cancer-pku.cn/>)。

1.2.8 统计分析

使用 Excel 和 GraphPad 软件进行统计分析和作图,使用 *t* 检验(*t* test)分析数据以确定不同组之间的显著性差异。**P*<0.05; ***P*<0.01; ****P*<0.001。

2 结果与讨论

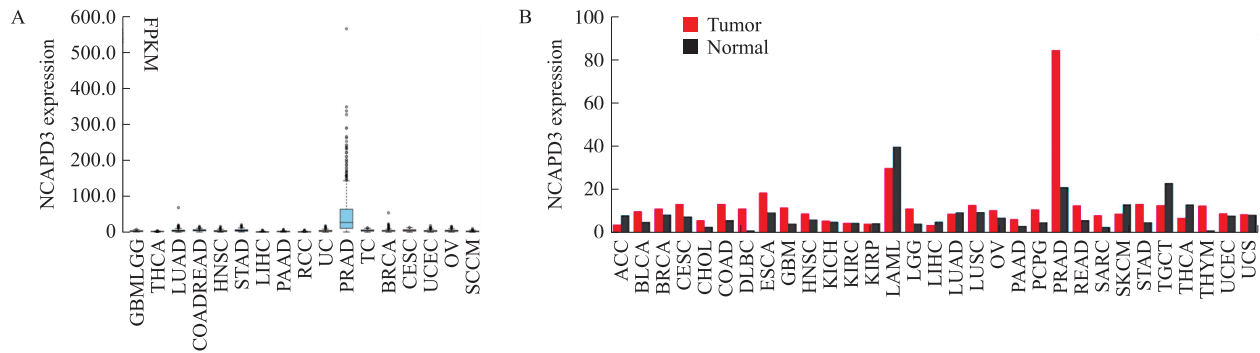
2.1 前列腺癌组织样本中,NCAPD3 显著提高

有研究表明,NCAPD3 的异常表达与肿瘤的发生发展密切相关^[14]。在前列腺癌中,NCAPD3 的表达与前列腺癌根治术后肿瘤复发率有关^[15]。利用 The-Human-Protein-Atlas 数据库的转录组学数据分析 NCAPD3 在各种癌症组织样本中的表达水平,分析显示在前列腺癌组织样本中,NCAPD3 的表达水平显著高于其他类型的癌症组织样本(如图 1A 所示)。此外,利用 GEPIA 数据库的转录组学数据进行分析,结果表明 NCAPD3 在前列腺癌组织样本中的表达水平显著高于正常前列腺组织样本(如图 1B 所示)。

2.2 前列腺癌细胞中,NCAPD3 促进 AKT 的磷酸化

AKT 及其下游相关信号通路的异常激活会显著促进前列腺癌的发展进程^[16]。为探究在前列腺癌细胞中 NCAPD3 与 AKT 激活之间的相关性,选取正常前列腺基质永生化细胞 WPMY-1、前列腺增生细胞 BPH-1 以及 4 种前列腺癌细胞 PC-3、DU145、22RV1 和 LNCaP,利用 RT-PCR 和 Western-blot 检测 NCAPD3 在各种细胞中 mRNA 水平和蛋白水平,p-AKT(Ser473)的蛋白磷酸化水平。结果显示 NCAPD3 在前列腺癌细胞中的表达水平(包括 mRNA 水平和蛋白水平)明显高于正常前列腺细胞和前列腺增生细胞;p-AKT(Ser473)磷酸化水平在前列腺癌细胞表达上升(图 2A、B)。进一步在前列腺癌细胞 DU145 和 LNCaP 中过表达或敲低 NCAPD3,Western-blot 检测 AKT(Thr308 和 Ser473)的磷酸化水平和总 AKT 蛋白水平,发现 DU145 细胞中过表达 NCAPD3 后,AKT 的磷酸化水平上升;反之,在 LNCaP 中使用 siNCAPD3 敲低 NCAPD3 后,AKT 的磷酸化水平

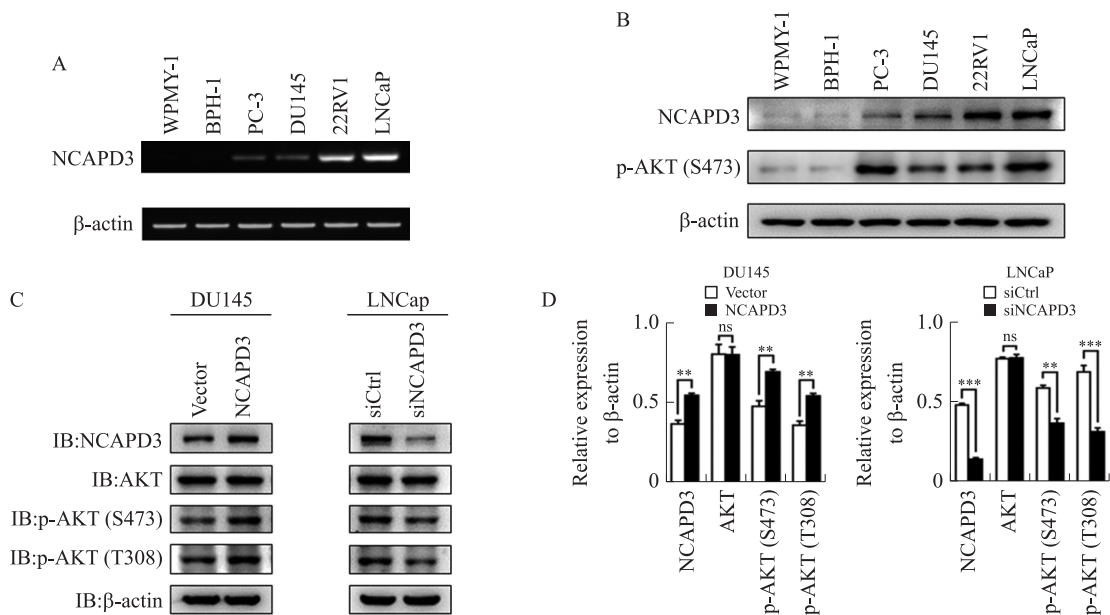
下调;而 AKT 总蛋白水平没有明显变化(图 2C、D)。以上结果表明 NCAPD3 促进 AKT 的磷酸化修饰。



A: The-Human-Protein-Atlas 数据库分析 NCAPD3 在各大癌症中的表达差异; B: GEPIA 数据库分析 NCAPD3 在前列腺癌和正常组织中的表达差异。

图 1 不同癌症及正常组织 NCAPD3 表达水平

Fig. 1 Expression level of NCAPD3 in different cancers and normal tissues



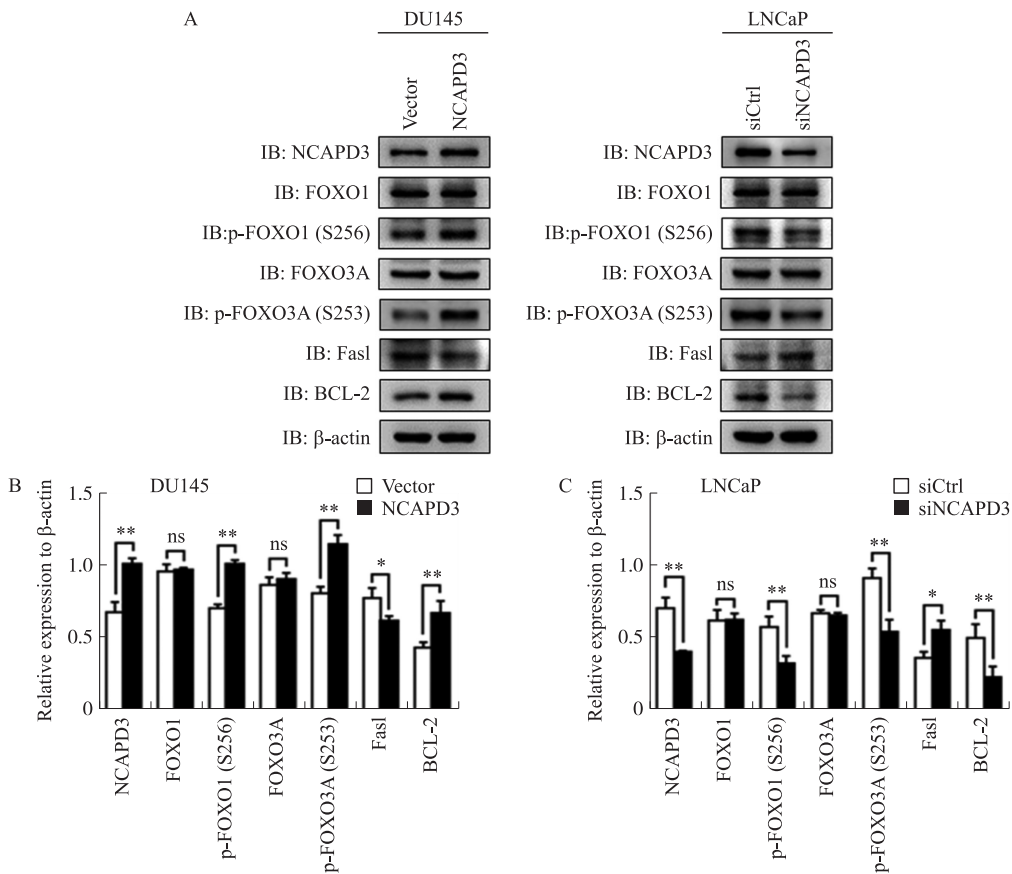
A: NCAPD3 在 6 种前列腺细胞系中的 mRNA 水平; B: NCAPD3 在 6 种前列腺癌细胞系中的蛋白水平; C: DU145、LNCaP 细胞分别过表达或敲低 NCAPD3 后, Western blotting 检测 NCAPD3、AKT、p-AKT (S473)、p-AKT (T308) 的蛋白水平; D: 图 C 蛋白条带灰度分析结果。 ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, ns 是无显著性差异。

图 2 前列腺癌细胞中 NCAPD3 的表达对 AKT 磷酸化的影响

Fig. 2 Effect of NCAPD3 expression on Akt phosphorylation in prostate cancer cells

2.3 NCAPD3 促进 FOXO1 和 FOXO3A 的磷酸化

在前列腺癌细胞中, AKT 下游靶基因 FOXO1 和 FOXO3A 转录因子在癌细胞的凋亡、代谢、周期阻滞以及免疫调节中起着关键作用^[17-18]。为探究 NCAPD3 是否能调控 FOXO1 和 FOXO3A 活性, 进而影响前列腺癌细胞的凋亡, 分别在 LNCaP 中 siRNA 敲低 NCAPD3 和 DU145 中过表达 NCAPD3, Western blot 检测相关蛋白水平, 结果如图 3 所示。在 DU145 中过表达 NCAPD3 后, FOXO1 (S256) 和 FOXO3A (S253) 的磷酸化水平明显上调; 敲低 NCAPD3 的 LNCaP 细胞中, FOXO1 (S256) 和 FOXO3A (S253) 的磷酸化水平明显下降(图 3A)。进一步检测 FOXO1 和 FOXO3A 下游凋亡相关因子的水平, 结果发现在 DU145 中过表达 NCAPD3 后, 凋亡相关因子 FasL 的蛋白水平下降, 而抗凋亡蛋白 BCL-2 的蛋白水平明显升高; 敲低 NCAPD3 的 LNCaP 细胞中, 则结果恰好相反(图 3A)。以上结果表明, NCAPD3 促进 FOXO1、FOXO3A 相应位点的磷酸化, 而文献报道 FOXO1 (S256) 和 FOXO3A (S253) 的磷酸化会促进其蛋白质出核, 进而使其转录活性降低, 最终抑制前列腺癌细胞发生凋亡。

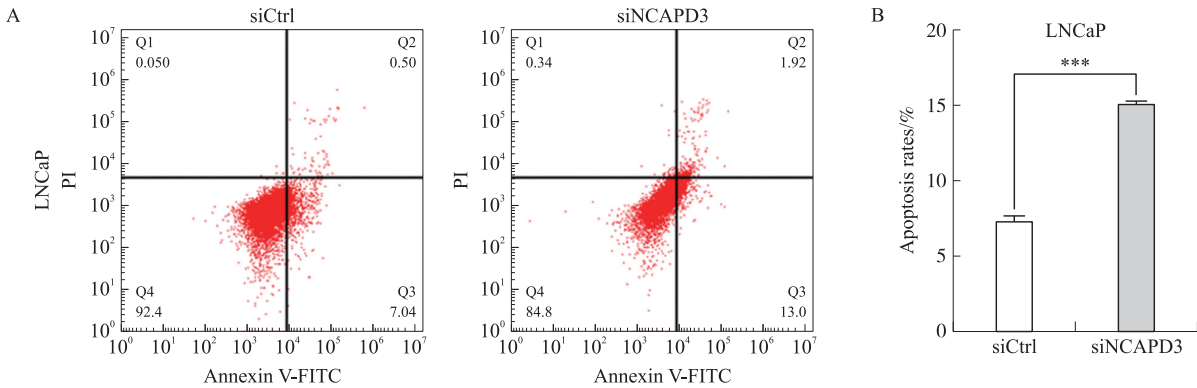


A: DU145、LNCaP 细胞分别转染 NCAPD3 质粒、NCAPD3 siRNA, 48 h 后提取细胞总蛋白, Western blotting 检测 NCAPD3、FOXO1、p-FOXO1 (Ser 256)、FOXO3A、p-FOXO3A (Ser 253)、FasL、BCL-2 的表达情况; B: 图 A 蛋白条带灰度分析结果; * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; ns 是无显著性差异。

图 3 NCAPD3 通过磷酸化 FOXO1 和 FOXO3A 降低其转录活性, 进而抑制前列腺癌细胞发生凋亡
Fig. 3 NCAPD3 inhibits apoptosis of prostate cancer by regulating the activity of FOXO1 and FOXO3A

2.4 敲低 NCAPD3 促进前列腺癌细胞发生细胞凋亡

由于在野生型前列腺癌细胞中的凋亡率就极低, 因此即使过表达 NCAPD3 也难以再明显降低前列腺癌细胞的凋亡比率。为此, 本研究在高表达 NCAPD3 的 LNCaP 细胞中用 siRNA 敲低 NCAPD3, 检测细胞凋亡情况, 以此证明 NCAPD3 的敲低可以促进前列腺癌细胞发生凋亡, 进而证明 NCAPD3 可以抑制前列腺癌细胞的凋亡作用。LNCaP 细胞用 siRNA 敲除 NCAPD3 48 h 后, 收集细胞进行流式细胞术检测细胞凋亡情况, 结果如图 4 所示。在敲低 NCAPD3 后, 前列腺癌细胞 LNCaP 的凋亡细胞数目增加, 凋亡细胞比例升高。



A: LNCaP 细胞转染 NCAPD3 siRNA, 48 h 后收集细胞用流式细胞仪分析细胞凋亡情况; B: 图 A 中凋亡细胞比例统计分析结果; *** $P < 0.001$ 。

图 4 敲低 NCAPD3 促进前列腺癌细胞发生凋亡
Fig. 4 Knockdown of NCAPD3 promotes apoptosis of prostate cancer cells

3 结论

NCAPD3 作为凝缩蛋白复合物 II 的一个亚基,在细胞的有丝分裂中起到重要的作用,但是有关 NCAPD3 与前列腺癌的相关性及其分子机制尚未见报道. AKT 信号通路是癌症研究中众所关注的重点,AKT 信号通路能够调控各种不同的细胞功能,如代谢、生长、增殖、迁移、转录以及蛋白质合成^[19]. 而在癌症中,由于该信号通路的异常激活,使得这些细胞功能往往处于失调状态. 因此,在大部分的癌症中,AKT 通路是被异常激活的. 大量文献报道,AKT 通路在前列腺癌被异常磷酸化而激活,并在前列腺癌的发生、发展中发挥重要的作用^[20]. 本研究通过数据库相关数据分析相对于其他癌症,NCAPD3 在前列腺癌中表达更加显著,并且比较前列腺正常组织与癌症组织中 NCAPD3 的表达情况,可以发现 NCAPD3 的表达水平在前列腺癌组织中明显高于正常组织,说明 NCAPD3 在前列腺癌中是异常高表达的. 通过蛋白质免疫印迹实验证明 NCAPD3 在前列腺癌中可以促进 AKT 的磷酸化,AKT 被磷酸化激活后,一方面可以进一步激活下游相关促癌分子信号通路,促进前列腺癌细胞的生长、增殖和转移;另一方面,NCAPD3 通过促进转录因子 FOXO1 和 FOXO3A 的磷酸化,促使其从细胞核转移到细胞质中,抑制 FOXO1 和 FOXO3A 引起的细胞凋亡相关的蛋白因子(如 FasL 和 Bcl-2 等)的表达,抑制前列腺癌细胞发生凋亡.

有文献报道,在小鼠结直肠癌中,NCAPD3 高表达导致染色体不稳定,进而促进结直肠癌的进展^[21];在胰腺癌中,NCAPD3 可以作为临床患者的预后因子^[22]. 这些结果均表明 NCAPD3 在癌症的发生发展中可能发挥促癌的作用. 在本实验中,首次发现 NCAPD3 通过激活 AKT 信号通路促进前列腺癌的恶性进展. NCAPD3 可以调节 AKT 磷酸化修饰,但 NCAPD3 是染色质凝缩蛋白复合物 II 的一个亚基,又是如何调节 AKT 磷酸化修饰水平的呢? AKT 经典的上游磷酸化激酶是 PI3K,那么,NCAPD3 是否是通过激活 PI3K,进而磷酸化激活 AKT 的呢? 其中具体的分子机制需要进一步探究.

本实验首次发现 NCAPD3 通过磷酸化激活 AKT,进而激活 AKT 下游一系列促进前列腺癌细胞生长、增殖的信号通路,促进前列腺癌的发生发展;同时,磷酸化激活的 AKT 通过调控 FOXO1 和 FOXO3A 的转录活性,抑制前列腺癌细胞发生凋亡作用,有利于癌细胞的生长;最终导致促进前列腺癌的总效应. 可见,NCAPD3 在前列腺癌中是一个促癌基因,有可能成为前列腺癌的一个新的临床诊断和治疗的靶基因.

[参考文献]

- [1] PEREZ C A, FENSOM G K, ANDREWS C, et al. Examination of potential novel biochemical factors in relation to prostate cancer incidence and mortality in UK Biobank[J]. British journal of cancer, 2020, 123(12): 1808-1817.
- [2] MOROVA T, MCNEILL D R, LALLOUS N, et al. Androgen receptor-binding sites are highly mutated in prostate cancer[J]. Nature communications, 2020, 11(1): 832.
- [3] COUDERC A L, NICOLAS E, BOISSIER R, et al. Impact of androgen deprivation therapy associated to conformal radiotherapy in the treatment of d'amico intermediate-/high-risk prostate cancer in older patients[J]. Cancers(Basel), 2020, 13(1): 75.
- [4] KAKUI Y, UHLMANN F. SMC complexes orchestrate the mitotic chromatin interaction landscape[J]. Current genetics, 2018, 64(2): 335-339.
- [5] HIRANO T. Condensin-based chromosome organization from bacteria to vertebrates[J]. Cell, 2016, 164(5): 847-857.
- [6] PAUL M R, HOCHWAGEN A, ERCAN S. Condensin action and compaction[J]. Current genetics, 2019, 65(2): 407-415.
- [7] ZHANG P, LIU L, HUANG J, et al. Non-SMC condensin I complex, subunit D2 gene polymorphisms are associated with Parkinson's disease: a Han Chinese study[J]. Genome, 2014, 57(5): 253-257.
- [8] YUAN C W, SUN X L, QIAO L C, et al. Non-SMC condensin I complex subunit D2 and non-SMC condensin II complex subunit D3 induces inflammation via the IKK/NF- κ B pathway in ulcerative colitis[J]. World journal of gastroenterology, 2019, 25(47): 6813-6822.
- [9] MARTIN C A, MURRAY J E, CARROLL P, et al. Mutations in genes encoding condensin complex proteins cause microcephaly through decatenation failure at mitosis[J]. Genes development, 2016, 30(19): 2158-2172.
- [10] DAWKINS J B, WANG J, MANIATI E, et al. Reduced expression of histone methyltransferases KMT2C and KMT2D correlates with improved outcome in pancreatic ductal adenocarcinoma[J]. Cancer research, 2016, 76(16): 4861-4871.

(下转第 102 页)

- [23] LALITHA S. Primer premier 5[J]. Biotech software and internet report,2000,1(6):270-272.
- [24] KUMAR S, STECHER G, LI M, et al. MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms[J]. Molecular biology and evolution,2018,35(6):1547-1549.
- [25] KALINOWSKI S T, TAPER M L, MARSHALL T C. Revising how the computer program cervus accommodates genotyping error increases success in paternity assignment[J]. Molecular ecology,2007,16(5):1099-1106.
- [26] 程方圆,陶紫玉,李晨虹. 应用单核苷酸多态性(SNP)标记鉴定短颌鲚、湖鲚和刀鲚[J]. 上海海洋大学学报,2019,28(1):10-19.
- [27] JIANG H H, LI B, MA Y, et al. Forensic validation of a panel of 12 SNPs for identification of Mongolian wolf and dog[J]. Scientific reports,2020,10(1):13249.
- [28] YANG J, LI X, LI Y, et al. Isolation and characterization of 30 SNP markers in Guangdong bream(*Megalobrama terminalis*) by next-generation sequencing[J]. Conservation genetics resources,2020,12:399-402.
- [29] HUBERT S, HIGGINS B, BORZA T, et al. Development of a SNP resource and a genetic linkage map for Atlantic cod(*Gadus morhua*)[J]. BMC genomics,2010,11:191.
- [30] 孙雪,李胜杰,姜鹏,等. 利用 RNA-Seq 技术开发草鱼生长性状相关基因和 SNP 标记[J]. 水产学报,2021,45(3):333-344.
- [31] 宋伟,王风格,田红丽,等. 利用核心 SNP 位点鉴别玉米自交系的研究[J]. 玉米科学,2013,21(4):28-32.
- [32] BOTSTEIN D, WHITE R L, SKOLNICK M, et al. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms[J]. American journal of human genetics,1980,32(3):314-331.
- [33] LAPÈGUE S, HEURTEBISE S, CORNETTE F, et al. Genetic characterization of cupped oyster resources in europe using informative single nucleotide polymorphism(SNP)panels[J]. Genes,2020,11(4):451.

[责任编辑:黄 敏]

(上接第95页)

- [11] REAGAN S S, AHMAD N. RNA interference-mediated depletion of phosphoinositide 3-kinase activates forkhead box class O transcription factors and induces cell cycle arrest and apoptosis in breast carcinoma cells[J]. Cancer research,2006,66(2):1062-1069.
- [12] FARHAN M, WANG H, GAUR U, et al. FOXO signaling pathways as therapeutic targets in cancer[J]. International journal of biological sciences,2017,13(7):815-827.
- [13] FABRE S, LANG V, BISMUTH G. PI3-kinase and the control of T cell growth and proliferation by FoxOs[J]. Bulletin du cancer,2006,93(5):E36-38.
- [14] MARK D M L. Pan-cancer network analysis identifies combinations of rare somatic mutations across pathways and protein complexes[J]. Nature genetics,2015,47(2):106-114.
- [15] JACQUES L. hCAP-D3 expression marks a prostate cancer subtype with favorable clinical behavior and androgen signaling signature[J]. The American journal of surgical pathology,2008,32(2):205-209.
- [16] CHEN H, ZHOU L, WU X, et al. The PI3K/AKT pathway in the pathogenesis of prostate cancer[J]. Frontiers in bioscience (Landmark Ed),2016,21:1084-1091.
- [17] MATSUZAKI H, LEE S, MAEDA M, et al. FoxO1 regulates apoptosis induced by asbestos in the MT-2 human T-cell line[J]. Journal of immunotoxicology,2016,13(5):620-627.
- [18] FASANO C, DISCIGLIO V, BERTORA S. FOXO3a from the nucleus to the mitochondria: a round trip in cellular stress response[J]. Cells,2019,8(9):1110.
- [19] PORTA C, PAGLINO C, MOSCA A. Targeting PI3K/Akt/mTOR signaling in cancer[J]. Frontiers oncology,2014,4:64.
- [20] CHEN H, ZHOU L, WU X, et al. The PI3K/AKT pathway in the pathogenesis of prostate cancer[J]. Frontiers in bioscience (Landmark Ed),2016,21:1084-1091.
- [21] PUSSILA M, TÖRÖNEN P, EINARSDOTTIR E, et al. Mlh1 deficiency in normal mouse colon mucosa associates with chromosomally unstable colon cancer[J]. Carcinogenesis,2018,39(6):788-797.
- [22] DAWKINS J B, WANG J, MANIATI E, et al. Reduced expression of histone methyltransferases KMT2C and KMT2D correlates with improved outcome in pancreatic ductal adenocarcinoma[J]. Cancer research,2016,76(16):4861-4871.

[责任编辑:黄 敏]