

亨廷顿蛋白相关蛋白1基因对小鼠成纤维细胞增殖的影响*

曹媛媛, 杨桂枝, 龚艳菊, 赵佳, 冯颖, 郑翔, 周雪[△]

四川大学华西基础医学与法医学院 组织胚胎学与神经生物学教研室(成都 610041)

【摘要】目的 研究亨廷顿蛋白相关蛋白1(Huntingtin-associated protein 1, *Hap1*)基因对成纤维细胞增殖的影响。**方法** 体外分离培养获得*Hap1*基因敲除(*Hap1*^{-/-})的原代成纤维细胞, 鉴定后采用EdU增殖实验、细胞周期(流式细胞术)检测验证*Hap1*成纤维细胞增殖的改变; 将野生型和*Hap1*^{-/-}成纤维细胞送转录组测序筛选增殖相关基因, 实时荧光定量PCR(qPCR)验证相关基因表达水平的改变。对小鼠进行皮肤损伤造模检测*Hap1*敲减(*Hap1*^{+/-})小鼠皮肤损伤修复情况; PCNA免疫组化染色检测损伤修复过程中成纤维细胞的增殖水平。**结果** 成功培养原代*Hap1*^{-/-}成纤维细胞; 与野生型成纤维细胞相比, *Hap1*^{-/-}成纤维细胞EdU阳性比例减少, 进入S期的细胞比例减少; 原代成纤维细胞转录组测序筛选出*Cdc25C*、*E2f7*、*E2f8*和*Ccl5*四个差异表达的增殖相关基因, qPCR验证发现*E2f7*在*Hap1*敲除后表达增多。小鼠皮肤损伤结果显示, *Hap1*^{+/-}小鼠伤口面积较相同时间点野生型小鼠伤口面积大且愈合速度减慢, 成纤维细胞增殖阳性密度低于野生型小鼠。**结论** *Hap1*可能通过抑制细胞周期负性调节因子*E2f7*的表达对成纤维细胞增殖起正向调节作用, 其缺失将抑制成纤维细胞进入S期, 从而减少细胞增殖, 影响伤口修复。

【关键词】 亨廷顿蛋白相关蛋白1 成纤维细胞 增殖 损伤修复

Effect of Huntingtin-associated Protein 1 Gene on Proliferation of Mouse Fibroblasts CAO Yuan-yuan, YANG Gui-zhi, GONG Yan-jü, ZHAO Jia, FENG Ying, ZHENG Xiang, ZHOU Xue[△]. Department of Histology, Embryology and Neurobiology, West China School of Basic Medical Science & Forensic Medicine, Sichuan University, Chengdu 610041, China

[△] Corresponding author, E-mail: zhouxue7239@163.com

【Abstract】 Objective To determine the effect of Huntingtin-associated protein 1 (*Hap1*) on fibroblast proliferation. **Methods** *Hap1* knockout (*Hap1*^{-/-}) primary fibroblasts were isolated and cultured *in vitro*. The proliferation of *Hap1*^{-/-} fibroblasts was detected by EdU proliferation assay and cell flow assay. Transcriptome sequencing of the wild-type and *Hap1*^{-/-} fibroblasts was screened for proliferation-related genes. Real-time quantitative PCR (qPCR) was performed to verify changes in expressions of related genes. Skin repair was examined in *Hap1* knockdown mice with skin wounds. The proliferation of fibroblasts during wound repair was detected by PCNA immunohistochemical staining. **Results** *Hap1*^{-/-} fibroblasts were successfully cultured. Compared with WT, EdU-positive fibroblasts decreased in *Hap1*^{-/-}, with less cells entering the S phase. Transcriptome sequencing of primary fibroblasts identified genes of *Cdc25C*, *E2f7*, *E2f8* and *Ccl5*. qPCR confirmed that *Hap1* knockout increased *E2f7* expression. *Hap1*^{+/-} mice had larger skin lesions, slower healing and lower positive density of fibroblast proliferation than those of wild type mice. **Conclusion** *Hap1* may positively regulate fibroblast proliferation by inhibiting the expression of cell cycle negative regulator *E2f7*. Its deletion inhibits fibroblasts entering the S phase, thereby reducing cell proliferation and affecting wound repair.

【Key words】 Huntingtin-associated protein 1 Fibroblast Proliferation Wound repair

临床上经常会遇到皮肤损伤修复异常的情况, 如在糖尿病等疾病状态下, 创口迟迟不能愈合, 存在损伤修复困难的情况; 而在修复过度或修复失调时, 则会形成瘢痕, 影响美观。成纤维细胞是真皮中数量最多的细胞, 也是皮肤损伤修复最重要的细胞之一^[1], 对不同程度的细胞变性、坏死和组织缺损的修复有重要作用^[2]。因此探明成纤维细胞增殖的调控机制无疑对于促进皮肤损伤修复

具有十分重要的理论意义和应用价值。已知成纤维细胞的增殖受到多种因素调节, 包括细胞外基质^[1]、生长因子^[3]、细胞因子^[4]、多肽^[5]等, 尽管如此, 其调控机制尚远未完全阐明。研究表明, 亨廷顿蛋白相关蛋白1(Huntingtin-associated protein 1, *Hap1*)可以促进下丘脑神经元增殖^[6], 但对乳腺癌细胞的增殖有抑制作用^[7]。*Hap1*基因对成纤维细胞增殖的作用未见报道。本实验通过体内体外实验对*Hap1*基因与成纤维细胞增殖之间的关系进行研究, 并初步探索*Hap1*基因影响成纤维细胞增殖的机制, 为促进正常的皮肤损伤修复提供实验基础。

* 成都科技局惠民项目(No. 2016-HM01-00514-SF)资助

[△] 通信作者, E-mail: zhouxue7239@163.com

1 材料与方法

1.1 动物、主要试剂和主要仪器

C57BL/6J *Hap1* 基因敲减 (*Hap1*^{+/-}) 小鼠来自 Jackson 实验室, C57BL/6J 野生型小鼠来自简阳达硕动物科技有限公司。所有小鼠饲养在恒温环境中 (25±1) °C, 12 h 光/暗周期, 可自由获取水和饲料。

主要试剂和仪器: PCR Master Mix、PrimeScript 逆转录试剂盒和 TB Green qPCR 试剂盒购自 TaKaRa 公司, DNA Marker 购自天根生化, 高糖 DMEM 培养基购自 Gibco 公司, 胎牛血清 (FBS) 购自灏洋生物公司, EdU 细胞增殖流式检测试剂盒购自锐博生物公司, 通用 SP 试剂盒 (兔链霉卵白素-生物素法检测系统) 购自北京中杉金桥公司, 兔抗增殖细胞核抗原 (PCNA) 抗体购自 Abcam 公司, 兔抗波形蛋白 (Vimentin) 抗体购自博士德公司; PCR 仪和实时定量 PCR 仪购自 BIO-RAD 公司, 流式细胞仪购自 Beckman 公司, 数字扫描显微成像系统购自 Precipoint 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 成纤维细胞的体外分离培养及鉴定

1.2.1.1 PCR 鉴定杂交子代小鼠 *Hap1* 基因的敲除
用 *Hap1*^{+/-} 基因型的雌雄小鼠 (来自 Jackson 实验室) 杂交获得子代, 取新生鼠尾巴, 加 50 mmol/L NaOH 180 μL, 沸水浴 1 h, 加 1 mol/L Tris-HCl (pH 8.0) 20 μL, 离心上清即为 DNA 溶液。引物见表 1。PCR 总反应体系 25 μL。反应程序 95 °C 预变性 3 min, 变性 95 °C 30 s, 退火 62 °C 30 s, 延伸 72 °C 30 s, 共 35 个循环。PCR 产物行琼脂糖凝胶电泳, 成像观察结果定性判定基因型。

表 1 *Hap1* 基因鉴定引物

Table 1 *Hap1* gene identification primer

Gene name	Sequence
WT	F: 5'-TTTGGAGGCTGGTCTCGCTCTG-3'
	R: 5'-CTTCATGTGGATGCTAGGGATCC-3'
<i>Hap1</i>	F: 5'-GTGGCGCTGAGTCTGGATTGAC-3'
	R: 5'-TACCCTACCCGGTAGAATTCG-3'

WT: Wild type

1.2.1.2 成纤维细胞的分离培养 取 *Hap1* 敲除 (*Hap1*^{-/-}) 组和野生型 (WT) 组胎鼠背部皮肤, 用组织块培养法获得原代细胞, 采用含 100 mL/L 胎牛血清和 10 mL/L 双抗 (青霉素和链霉素) 的 DMEM 培养基于 37 °C、50 mL/L CO₂ 的条件下培养, 用于后续实验。

1.2.1.3 免疫荧光法染成纤维细胞 细胞爬片用纯甲醇固定, PBS 洗涤, 滴加封闭液, 室温封闭 1 h; 滴加一抗

Vimentin (1:1000, 成纤维细胞标记), 4 °C 湿盒过夜; PBS 洗涤, 滴加二抗, 室温避光孵育 1 h; PBS 洗涤, 滴加 DAPI (1:1000), 室温避光孵育 5 min; PBS 洗涤, 滴加抗荧光淬灭封片剂封片, 荧光显微镜下观察。

1.2.1.4 实时荧光定量 PCR (qPCR) 法验证 *Hap1*^{-/-} 组细胞中 *Hap1* 的表达 成纤维细胞用含 100 mL/L 胎牛血清的 DMEM 培养基培养至正常生长, 胰酶消化得细胞悬液, 用 Trizol 法提取细胞总 RNA, 测 RNA 浓度; 每个样本取 1 μg RNA 逆转录为 cDNA。以 β-actin 为内参, 取逆转录的 cDNA 进行 qPCR, 引物见表 2。反应程序 95 °C 预变性 30 s, 变性 95 °C 5 s, 退火延伸 60 °C 30 s, 共 40 个循环。用 2^{-ΔΔCt} 法进行计算基因的相对表达量。

表 2 qPCR 引物序列

Table 2 Primers used in qPCR

Gene name	Sequence	Product length/bp
β-actin	F: 5'-AGATTACTGCTCTGGCTCCTAGC-3'	147
	R: 5'-ACTCATCGTACTCCTGCTTGCT-3'	
<i>Cdc25C</i>	F: 5'-CCATTACTACGGTTCCTAAGCTGA-3'	176
	R: 5'-GCCAGACTCTTCCTCCTCCATC-3'	
<i>E2f7</i>	F: 5'-CTTGCTGTCTGTGACCATG-3'	155
	R: 5'-TCTGGATTCTTGCCGGGTT-3'	
<i>E2f8</i>	F: 5'-GACACCCAAAGGCTCCCAGTT-3'	159
	R: 5'-TCAGTTGAGACTTCCAGTTTGCG-3'	
<i>Ccl5</i>	F: 5'-CGTCAAGGAGTATTCTACACCAGC-3'	101
	R: 5'-ACTTCTTCTCTGGGTGGCACA-3'	
<i>Hap1</i>	F: 5'-CGTGC GGCTTTATTTCGAG-3'	131
	R: 5'-GCTGTGTTTCAGTCCCGTTC-3'	

1.2.2 5-乙炔基-2-脱氧尿嘧啶核苷 (5-Ethynyl-2'-deoxyuridine, EdU) 染色检测细胞增殖 取成纤维细胞, 以每孔细胞密度 3×10³ 接种于培养皿, 培养至第 2 天, 按 1:1 000 在培养基中加入 EdU 溶液, 孵育 12 h 和 24 h, 其余操作见说明书。染色完成后上流式细胞仪检测, 分析 EdU 阳性细胞比例。

1.2.3 流式细胞法检测细胞周期 取成纤维细胞, 在无血清条件下饥饿培养 6 h 后, 改用含 100 mL/L 胎牛血清培养基培养 24 h, 胰酶消化得细胞悬液, 将单细胞悬液 1 500 r/min 离心 5 min, 弃上清后加入 PBS 离心洗涤 1 次, 弃上清加入 300 μL PBS 重悬细胞, 加入 700 μL 酒精, 4 °C 固定过夜, 离心弃上清, PBS 洗涤, 加入含 50 μg/mL RNase A 的 PI 染液中孵育 30 min 后, 上流式细胞仪检测细胞周期。

1.2.4 转录组测序 取成纤维细胞, 无血清培养 6 h 后,

改用含 100 mL/L 血清的 DMEM 培养基培养, 胰酶消化得细胞悬液, 加 Trizol 后干冰保存送上海欧易生物医学科技有限公司进行转录组测序。其结果以 *Hap1*^{-/-} 组与 WT 组的比值 (fold change) 表示, >1 为基因表达增加, <1 为基因表达减少。

1.2.5 qPCR 检测细胞增殖相关基因 成纤维细胞无血清培养 6 h 后, 改用含 100 mL/L 胎牛血清的 DMEM 培养基培养, 胰酶消化得细胞悬液, 用 Trizol 法提取细胞总 RNA, 测 RNA 浓度; 每个样本取 1 μ g RNA 逆转录为 cDNA 进行 qPCR。以 β -actin 为内参, 引物见表 2, 反应条件同 1.2.1.4。

1.2.6 小鼠皮肤损伤模型的建立 取 WT 和 *Hap1*^{-/-} 成年小鼠各 12 只, 腹腔注射水合氯醛麻醉, 背部用脱毛剂脱毛, 标记手术部位, 常规消毒背部皮肤, 做一直径为 0.8 cm 的皮肤损伤创口, 深达皮下但不伤及肌肉组织。手术后小鼠单独喂养, 并保持创口干燥, 不沾染异物。

1.2.7 创面面积测定 手术当天记为 d0, 伤后第 1 天记为 d1, 以此类推, 分别于 d0 手术结束、d1、d3、d5、d7、d9、d11 和 d13 拍照, 直至创口完全愈合 (结痂掉落, 正常皮肤完全覆盖创口), 用 Image J 软件测量创口面积。损伤面积 (%) = 现损伤面积 / 原损伤面积 \times 100%。

1.2.8 免疫组织化学染色检测小鼠皮肤增殖细胞核抗原 (PCNA) 的表达 皮肤损伤术后 3 d, 麻醉小鼠, 取创口及周围 5 mm 以内的皮肤组织, 制作石蜡切片后进行免疫组织化学染色标记 PCNA (1:100)。每例动物标

本连续切片, 随机等距抽取 3 张片子, 染色后用 Precipoint M8 扫描系统成像, 400 倍镜下每张片子选取 3 ~ 5 个视野 (伤口结痂处与皮下肌组织之间的区域, 避开肌肉组织和炎症组织), 用 ViewPoint 软件测量视野面积并计数其内的阳性细胞数 (阳性信号位于细胞核, 呈棕色), 然后计算阳性细胞密度 (阳性细胞数 / 相应区域面积)。

1.3 统计学方法

数据均采用 $\bar{x} \pm s$ 表示。多重比较用方差分析, 两两比较用 *t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 原代成纤维细胞培养结果

新生鼠基因型鉴定结果见图 1。有 WT (仅有 550 bp 条带)、*Hap1*^{-/-} (仅有 350 bp 条带) 和 *Hap1*^{+/-} (出现 550 bp 和 350 bp 两条带) 三种基因型 (图 1A); 组织块里爬出的细胞呈长梭形、漩涡样生长, 两组形态一致 (图 1B), 免疫荧光染色标记 Vimentin, 两组细胞胞质均呈强阳性 (图 1C), 证明成功培养了原代成纤维细胞; WT 组成纤维细胞表达 *Hap1* 基因 (相对表达量 1×10^{-4}), 而 *Hap1*^{-/-} 组的成纤维细胞不表达 *Hap1* 基因 (相对表达量 0), 敲除成功。

2.2 EdU 增殖检测和细胞周期结果

见图 2。EdU 孵育 12 h 和 24 h 时, *Hap1*^{-/-} 组的 EdU 阳性细胞比例分别为 15% 和 24.6%, 低于同时点的 WT 组 (分别为 26.8% 和 42.1%), 且差异有统计学意义 ($P < 0.05$) (图 2A); 流式细胞法检测细胞周期, 发现 *Hap1*^{-/-} 组成纤维细胞进

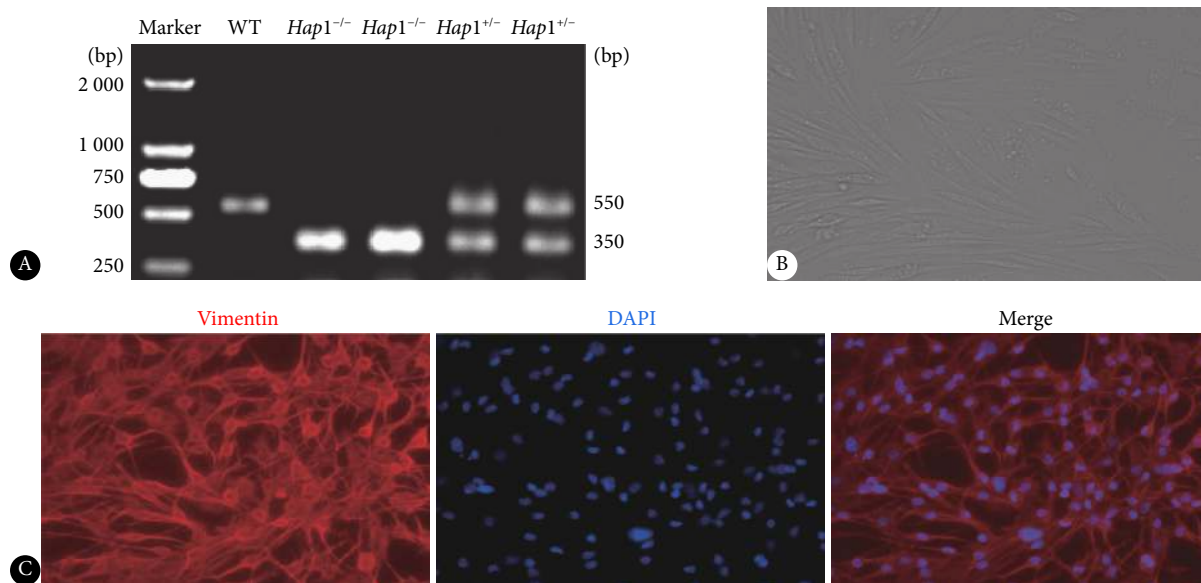


图 1 原代成纤维细胞培养及鉴定

Fig 1 Primary fibroblast culture and identification

A: PCR; B: 5 d cultured fibroblasts, $\times 200$; C: Primary fibroblast Vimentin immunofluorescence staining (red for Vimentin, blue for nuclear DAPI) $\times 200$

入S期的比例减少, 与WT组相比, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$) (图2B)。

2.3 转录组测序及qPCR验证结果

分析转录组测序结果发现 (图3A), 11种与细胞增殖相关的基因表达有差异 (图3B), 进一步查阅数据库中与

细胞增殖关系密切的基因, 选择了 *Cdc25C*、*E2f7*、*E2f8* 和 *Ccl5* 基因; qPCR验证发现 *Hap1* 敲除后, *Hap1*^{-/-} 组细胞周期负性调节因子 *E2f7* 和 *E2f8* 较 WT 组表达增多 (分别为 0.576 vs. 0.288 和 0.7542 vs. 0.357), 其中 *E2f7* 的表达差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 而 *Cdc25C* 和 *Ccl5* 在 WT 组和

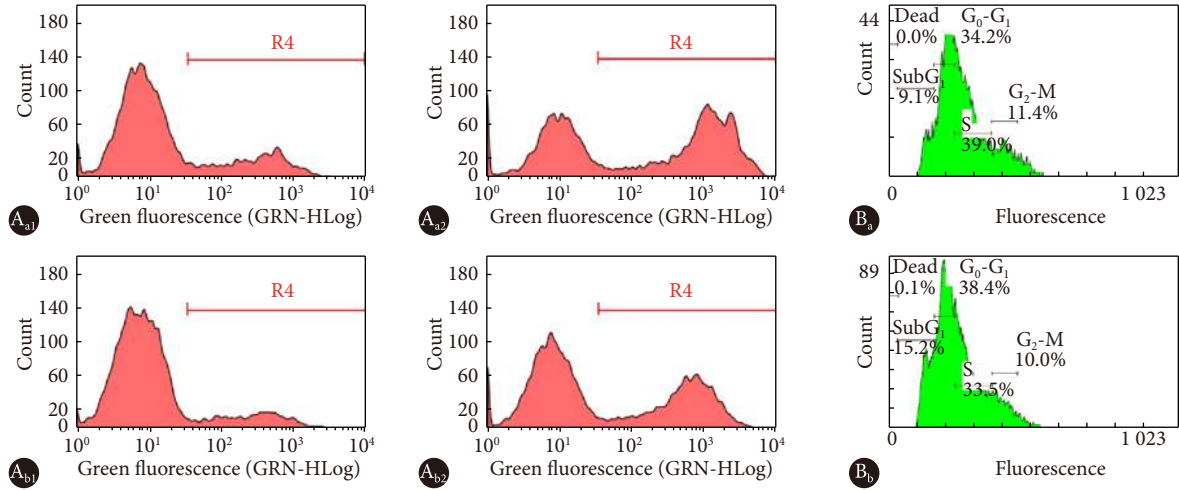


图 2 *Hap1* 敲除后成纤维细胞增殖能力

Fig 2 Fibroblast proliferation after *Hap1* knockout

A: EdU cell proliferation flow detection peak map; B: Fibroblast growth cycle detection a: WT group; b: *Hap1*^{-/-} group; 1:12 h; 2:24 h

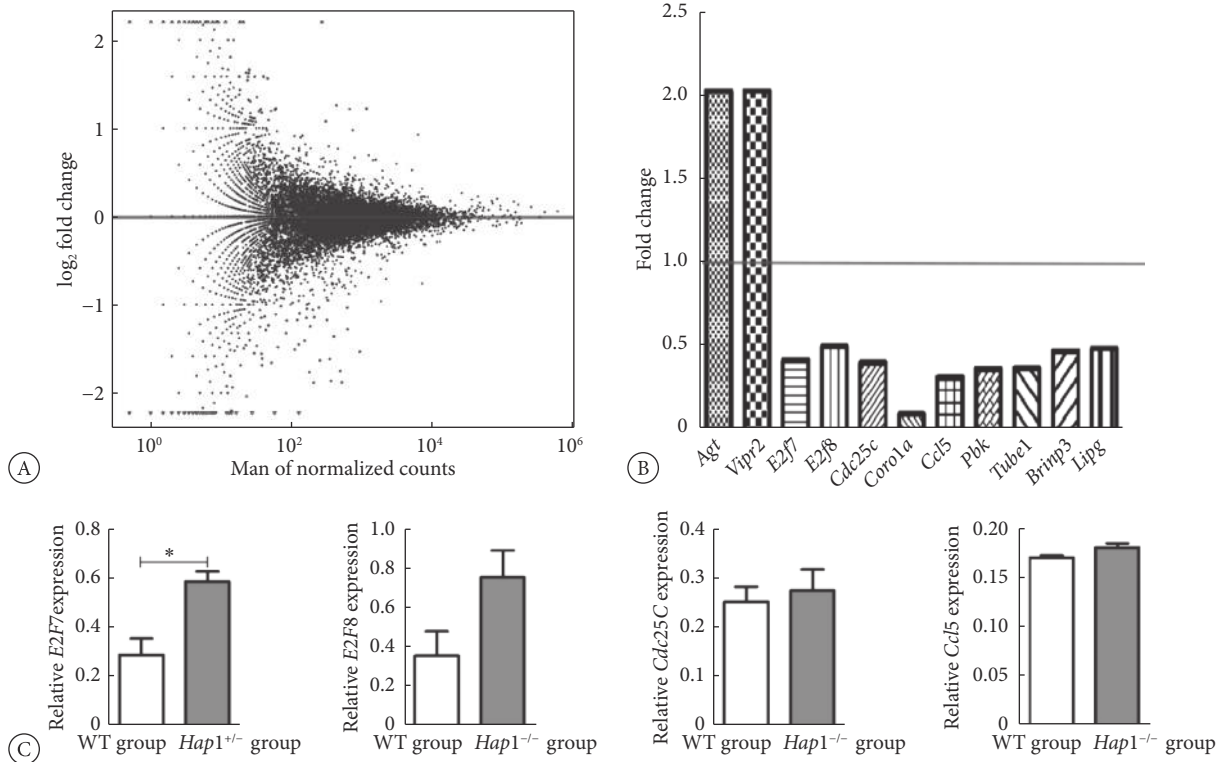


图 3 *Hap1* 敲除后成纤维细胞中细胞周期相关因子表达水平

Fig 3 Expressions of cell cycle-related factors in fibroblasts after *Hap1* knockout

A: Transcriptome sequencing results; B: Cell proliferation-related genes; C: qPCR validation results. * $P < 0.05$. The gray lines in A and B indicate that the expression level has not changed

Hap1^{-/-}组的表达差异无统计学意义(图3C)。

2.4 小鼠皮肤损伤修复及免疫组化结果

测量小鼠皮肤伤口面积,两种基因型之间差异有统计学意义($P<0.01$,图4)。皮肤损伤修复结果显示,Hap1^{+/-}鼠伤口完全恢复需要13 d,而WT鼠仅需11 d(图5A);损伤第3天损伤处组织样本做PCNA的免疫组织化学染色(图5B),Hap1^{+/-}组的增殖阳性细胞密度较WT组低($9\times 10^{-4}/\mu\text{m}^2$ vs. $1.4\times 10^{-3}/\mu\text{m}^2$),且差异有统计学意义($P<0.01$)。

3 讨论

Hap1是胞浆蛋白,主要在神经元表达。早期对Hap1的研究结果集中于其在神经元囊泡运输中的作用,例如Hap1与驱动蛋白轻链(kinesin light chain, KLC)相互

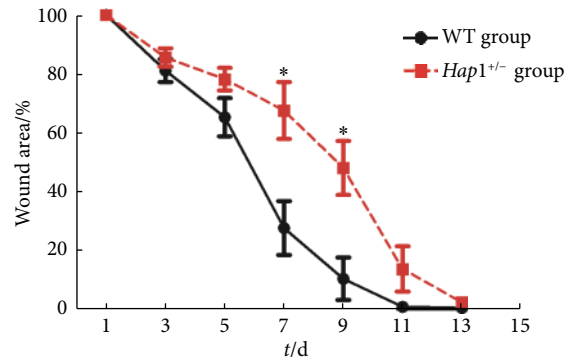


图4 小鼠皮肤损伤面积测量

Fig 4 Changes in skin lesion areas in mice

* $P<0.05$, vs. WT group at the same time point

作用参与轴突的顺向运输^[8];后来发现Hap1不仅参与中枢神经元囊泡运输,还参与外周部分内分泌细胞的胞内

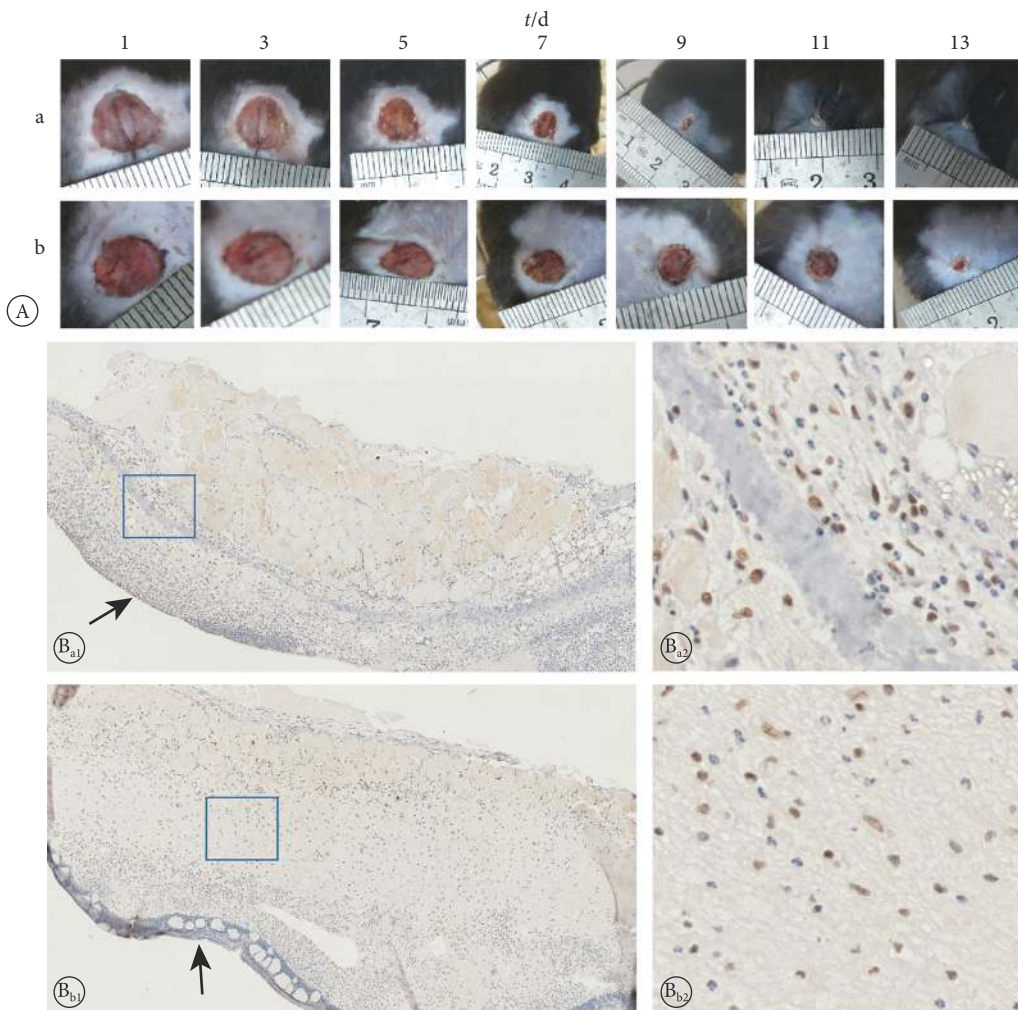


图5 小鼠皮肤损伤修复及细胞增殖能力

Fig 5 Skin damage repair and cell proliferation in mice

A. Changes in skin lesions over time; B: 3d lesion tissues PCNA immunohistochemical staining (1: $\times 100$; 2: $\times 400$), the arrows point to the damaged surface. a: WT group; b: Hap1^{+/-} group

转运,如胰岛 β 细胞分泌胰岛素^[9]等;此外,还发现Hap1参与表面受体的再循环和信号转导,如Hap1通过抑制 γ -氨基丁酸A型受体降解,促进受体循环,调节突触受体数^[10]。以上研究结果说明,Hap1功能多样,在体内发挥着重要的生理作用。

2014年XIANG等^[11]发现,神经球敲除Hap1后,细胞的BrdU阳性率降低,体内实验也发现Hap1敲除的小鼠大脑皮质、下丘脑、小脑中BrdU阳性细胞数量明显减少。该研究小组2015年再次报道^[6],在小鼠出生第1天时敲除Hap1,海马齿状回的BrdU阳性细胞数量减少。这些研究表明Hap1不仅参与了神经细胞增殖,而且对其增殖有正向调控作用。同样,我们的研究结果发现,Hap1对成纤维细胞的增殖也具有正向调控作用。我们首先在体外实验观察到,Hap1敲除小鼠的成纤维细胞增殖减慢,然后经细胞流式检测细胞周期,发现进入细胞增殖周期S期的细胞减少。S期主要是DNA合成,是完成细胞复制的重要时期,说明Hap1对成纤维细胞增殖的影响主要是在S期。因为成纤维细胞是真皮组织中数量最多的细胞,也是皮肤损伤后修复最重要的细胞之一^[1],所以我们进一步通过在体皮肤损伤实验对体外细胞实验结果进行验证。结果发现,Hap1敲减(因Hap1敲除小鼠无法存活,所以用杂合子小鼠做此实验)小鼠皮肤损伤修复需要更长的时间,免疫组化染色显示皮损修复区的增殖细胞数量减少(如上所述,因成纤维细胞是真皮组织的主要细胞成分,所以本实验将PCNA阳性细胞视作成纤维细胞)。为了初步探究Hap1对成纤维细胞增殖的影响机制,我们做了转录组测序,因为转录组测序可以获得某一状态下组织或细胞内所有转录产物(包括mRNA和非编码RNA)序列信息,是连接基因组遗传信息与生物功能的蛋白质组的必然联系。用qPCR对测序结果进行验证,发现Hap1敲除的成纤维细胞E2f7表达增加。已有研究表明,Hap1可以与TATA结合蛋白^[12]等转录因子相互作用来调节基因转录。E2f家族是经典的转录因子,E2f7是其中的非典型性E2f,在细胞周期中起负性调节作用。非典型性E2f抑制因子活性增加,可以下调大量细胞周期基因的表达,导致细胞周期严重阻滞。已有研究表明,过表达E2f7显著降低小鼠胚胎成纤维细胞的原代增殖^[13],异位表达可以延缓S期进展^[14]。本实验结果显示,Hap1敲除的成纤维细胞E2f7表达增多,细胞周期分析结果显示,进入S期的细胞减少,与已知实验结果相吻合。

本研究结果提示,Hap1可能通过抑制细胞周期负性

调控因子E2f7的表达,对成纤维细胞的增殖发挥正向调控作用,从而促进成纤维细胞增殖及皮肤损伤修复。但我们的研究未能揭示Hap1影响E2f7的具体途径及E2f7作用的下游分子,对整个调节过程涉及的信号通路还有待进一步的研究。本研究无法使用Hap1^{-/-}小鼠完全复制和验证体外细胞实验的结果,使用杂合子Hap1^{+/-}小鼠得到的结果,其机制或许与使用纯合子Hap1^{-/-}小鼠相同(只是强度不同),或许掩盖了另外一些只有在纯合子中才能发现的机制,有待探讨。

参 考 文 献

- [1] TRACY LE, MINASIAN RA, CATERSON EJ. Extracellular matrix and dermal fibroblast function in the healing wound. *Adv Wound Care (New Rochelle)*, 2016, 5(3): 119-136.
- [2] 王英慧. 成纤维细胞的生物学特性及其成骨作用的研究进展. 大同医学专科学校学报, 2006, 26(2): 30-32.
- [3] WERNER S and GROSE R. Regulation of wound healing by growth factors and cytokines. *Physiol Rev*, 2003, 83(3): 835-870.
- [4] XIAO L, DU Y, SHEN Y, et al. TGF-beta 1 induced fibroblast proliferation is mediated by the FGF-2/ERK pathway. *Front Biosci (Landmark Ed)*, 2012, 17: 2667-2674.
- [5] YASUDA J, FUKUI K, OKADA M, et al. T3 peptide, a fragment of tumstatin, stimulates proliferation and migration of cardiac fibroblasts through activation of Akt signaling pathway. *Naunyn Schmiedeberg Arch Pharmacol*, 2017, 390(11): 1135-1144.
- [6] XIANG J, YAN S, LI SH, et al. Postnatal loss of hap1 reduces hippocampal neurogenesis and causes adult depressive-like behavior in mice. *PLoS Genet*, 2015, 11(4): e1005175[2018-11-13].
- [7] 宋 雪, 朱丽伟, 唐金海, 等. HAP1对乳腺癌细胞MCF-7生物学特性影响的观察. 中华肿瘤防治杂志, 2013, 20(7): 497-501.
- [8] MCGUIRE JR, RONG J, LI SH, et al. Interaction of Huntingtin-associated protein-1 with kinesin light chain: implications in intracellular trafficking in neurons. *J Biol Chem*, 2006, 281(6): 3552-3559.
- [9] PAN JY, YUAN S, YU T, et al. Regulation of L-type Ca²⁺ Channel Activity and Insulin Secretion by Huntingtin-associated Protein 1. *J Biol Chem*, 2016, 291(51): 26352-26363.
- [10] KITTNER JT, THOMAS P, TRETTER V, et al. Huntingtin-associated protein 1 regulates inhibitory synaptic transmission by modulating gamma-aminobutyric acid type A receptor membrane trafficking. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004, 101(34): 12736-12741.
- [11] XIANG J, YANG H, ZHAO T, et al. Huntingtin-associated protein 1 regulates postnatal neurogenesis and neurotrophin receptor sorting. *J Clin Invest*, 2014, 124(1): 85-98.
- [12] PRIGGE JR and SCHMIDT EE. HAP1 can sequester a subset of TBP in cytoplasmic inclusions via specific interaction with the conserved TBP(CORE). *BMC Mol Biol*, 2007, 8: 76[2018-11-13].

- [13] MAITI B, LI J, DE BRUIN A, *et al.* Cloning and characterization of mouse E2F8, a novel mammalian E2F family member capable of blocking cellular proliferation. *J Biol Chem*, 2005, 280(18): 18211-18220. inhibit atypical E2Fs to prevent a permanent cell cycle arrest. *Embo J*, 2018, 37(5): pii: e97877 [2018-11-13].
(2018-09-10收稿, 2019-01-08修回)
- [14] YUAN R, VOS HR, VAN ES RM, *et al.* Chk1 and 14-3-3 proteins 编辑 吕熙