

家蝇三龄幼虫 *Mdctl* 基因原核表达及生物信息学分析*

常振策^{1**}, 李忠旬¹, 贾利娜¹, 修江帆¹, 国果^{1,2}, 吴建伟^{1,2***}

(1. 贵州医科大学 贵州省普通高等学校现代病原生物学特色重点实验室, 贵州 贵阳 550025; 2. 贵州医科大学 寄生虫学教研室, 贵州 贵阳 550025)

[摘要] 目的: 构建家蝇 C 型凝集素基因 (*Mdctl*) 原核表达体系, 对 *Mdctl* 基因及编码蛋白进行生物信息学分析。方法: 采用生物信息学方法, 分析 *Mdctl* 基因及编码蛋白; 将构建的 pET28a(+)/*Mdctl* 重组表达质粒转化至大肠杆菌 BL21-DE3 中, 以异丙基硫代半乳糖苷 (IPTG) 诱导表达重组蛋白并通过 SDS-PAGE 对表达产物进行分析; Ni-IDA 法纯化重组蛋白, Western-Blot 对其鉴定。结果: 生物信息学分析显示, *Mdctl* 基因开放阅读框全长 333 bp, 共编码 110 个氨基酸, 理论分子量为 13.13 kDa, 等电点为 4.49, 信号肽位于 1~22 位氨基酸之间; *Mdctl* 蛋白中存在 Clect 结构域, 属于 C 型凝集素超家族; *Mdctl* 重组蛋白在大肠杆菌 BL21-DE3 中主要以包涵体形式表达, 重组蛋白的相对分子质量与 *Mdctl* 蛋白两端融合 6×His 标签后的总分子量相一致。结论: 成功构建 *Mdctl* 原核表达系统, 并获得重组蛋白。

[关键词] 家蝇; *Mdctl* 基因; 原核表达; 蛋白纯化; 生物信息学; 基因表达

[中图分类号] R384.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1000-2707(2020)02-0145-06

DOI: 10.19367/j.cnki.1000-2707.2020.02.004

Prokaryotic Expression and Bioinformatics Analysis of *Mdctl* in the Housefly Third Instar Larva

CHANG Zhence¹, LI Zhongxun¹, JIA Lina¹, XIU Jiangfan¹, GUO Guo^{1,2}, WU Jianwei^{1,2}

(1. Key Laboratory of Modern Pathogenic Biology of Guizhou Higher Education Institutions, Guizhou Medical University, Guiyang 550025, Guizhou, China; 2. Department of Parasitology, Guizhou Medical University, Guiyang 550025, Guizhou, China)

[Abstract] Objective: To construct a prokaryotic expression system of *Musca domestica* C-type lectin gene (*Mdctl*) and perform bioinformatics analysis of *Mdctl* gene and *Mdctl*-encoded protein. **Methods:** The *Mdctl* gene and the encoded protein were analyzed by bioinformatics approach. The constructed recombinant plasmid pET28a(+)/*Mdctl* tagged with 6xHis was transformed into *E. coli* BL21-DE3 and *Mdctl* expression was induced by isopropyl thiogalactoside (IPTG). The expression of recombinant *Mdctl* protein was analyzed by SDS-PAGE. The recombinant *Mdctl* protein was purified by Ni-IDA purification kit and verified by Western Blot. **Results:** Bioinformatics analysis showed that the open reading frame of *Mdctl* gene is 333 bp in length and encodes 110 amino acids. The theoretical molecular weight is 13.13 kDa, and its the isoelectric point is 4.49. Moreover, the signal peptide in *Mdctl* is located between 1 and 22 amino acids. *Mdctl* protein has a Clect domain, which belongs to the C-type lectin superfamily. Furthermore, the *Mdctl* recombinant protein is mainly expressed in the form of inclusion bodies in *E. coli* BL21-DE3. Western blot analysis revealed that the molecular weight of purified recombinant *Mdctl* protein is the same as that of the recombinant *Mdctl* protein recognized by anti-His antibody. **Conclusion:** The prokaryotic expression system of *Mdctl* was successfully

* [基金项目] 国家自然科学基金项目(81360254); 国家科技支撑计划(2011BAC06B12); 贵州省农业攻关[黔科合 NY(2014)3054]; 贵州省科学技术基金[黔科合 J 字(2012)2038]

** 贵州医科大学 2016 级硕士研究生

*** 通信作者 E-mail: wjw@gmc.edu.cn

constructed and recombinant Mdctl protein was obtained.

[**Key words**] *Musca domestica*; *Mdctl* gene; prokaryotic expression; protein purification; bioinformatics; gene expression

家蝇生活在病原物富集的环境中,却鲜见感染造成的伤害,并且能够正常地完成生命活动,说明它具有强大的先天性免疫系统^[1-4]。近年来,家蝇的先天免疫日益成为研究热点。课题组前期研究发现,白假丝酵母菌感染家蝇三龄幼虫后可刺激家蝇 C 型凝集素基因(C-type lectin gene of *Musca domestica*, *Mdctl*) 表达上调,认为该基因的表达产物在家蝇抗 *C. albicans* 感染过程中起作用^[5],但目前尚未见有关 *Mdctl* 基因的研究报道。为后续研究 *Mdctl* 基因在家蝇幼虫抗 *C. albicans* 感染过程中的作用,本课题研究构建家蝇 *Mdctl* 基因原核表达体系,获得了纯化的 *Mdctl* 基因表达产物,并进行了生物信息学分析,现报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 动物、质粒和菌株 家蝇 3 龄幼虫为本课题组饲养,克隆感受态 *E. coli* DH5 α 和表达感受态 *E. coli* BL21(DE3,北京全式金),克隆载体 pMD19-T 购自 Takara 公司,表达载体 pET-28a(+) 购自 Solarbio 公司。

1.1.2 主要试剂及仪器 Trizol Reagent、PrimeScriptTM One Step RT-PCR Kit、原核表达相关试剂、氨苄青霉素购自 Takara, SDS-PAGE 蛋白电泳相关试剂、卡那霉素、羊抗小鼠 IgG-HRP、Anti-His Tag Mouse Monoclonal Antibody、Western-Blot 相关试剂及耗材购自 Solarbio, Ni-IDA Agarose His 标签蛋白纯化试剂盒购自碧云天公司。核酸凝胶电泳装置及成像系统、超声破碎仪、电转移装置、蛋白凝胶电泳装置均在贵州医科大学现代病原生物学重点实验室使用, Bio-Rad ChemiDoc MP 和 Nanodrop2000 在贵州医科大学基础医学科研中心使用。

1.2 方法

1.2.1 生物信息学分析 运用 DNAMAN V6.0 软件分析 *Mdctl* 基因的开放阅读框、氨基酸序列和 Mdctl 蛋白信号肽位点,利用 ProtParam (<http://expasy.org/tools/protparam.html>) 分析 Mdctl 蛋白的理化性质、SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de>)

分析 Mdctl 蛋白功能结构域。

1.2.2 pMD19-T/*Mdctl* 克隆载体和 pET28a(+)/*Mdctl* 表达载体的构建 按照 Trizol 说明书提取家蝇三龄幼虫总 RNA,然后以总 RNA 为模板,按照 PrimeScriptTM One Step RT-PCR Kit 逆转录合成 cDNA 作为 *Mdctl* 基因克隆时 PCR 扩增的模板。基因组 DNA 的除去反应条件为 42 °C 2 min,然后冰浴 5 min。逆转录反应条件为 37 °C 20 min, 85 °C 10 s, 4 °C 10 s。利用 Primer 5.0 设计 *Mdctl* 基因的克隆引物(CkF、CkR)和 *Mdctl* 基因的表达引物(CbF、CbR),由上海生工合成。*Mdctl* 基因克隆上游引物(CkF)为 ATGGGCGGTTACTTGGCCTC、游引物(CkR)为 TCAAAACGAACTAACTATGACTGTTTTCCGGC;*Mdctl* 基因表达上游引物(CbF)为 CTAGCTAGCGACTATTATCCAAGTACAGATGGTG,下游引物(CbR)为 CCCAAGCTTTCA

AAACGAACTAACTATGACTGTTTTTC。*Mdctl* 基因 PCR 扩增的反应条件为 94 °C 预变性 5 min, 94 °C 30 s, 60 °C 30 s, 72 °C 1 min, 30 个循环, 72 °C 最后延伸 10 min。PCR 产物用 DNA 凝胶试剂盒纯化回收,纯化 PCR 产物和 pMD19-T 载体连接条件为 16 °C 环境下作用 12 ~ 16 h。将 pMD19-T/*Mdctl* 转化至 *E. coli* DH5 α 克隆感受态细胞中, LB 平板(含氨苄青霉素 100 mg/L) 筛选阳性转化子,转接液体培养后提取重组质粒进行测序鉴定。以测序成功的 pMD19-T/*Mdctl* 克隆质粒为模板,扩增 *Mdctl* 基因。*Mdctl* 基因和 pET-28a(+) 载体双酶切反应条件为 37 °C 水浴酶切 16 ~ 18 h,酶切产物用 DNA 凝胶试剂盒纯化回收。酶切纯化后 *Mdctl* 基因和 pET-28a(+) 载体连接条件为 16 °C 环境下作用 16 ~ 18 h。将 pET28a(+)/*Mdctl* 转化至 *E. coli* DH5 α 感受态细胞中, LB 平板(含卡那霉素 50 mg/L) 筛选阳性转化子,转接液体培养后提取重组质粒进行测序鉴定。

1.2.3 重组蛋白诱导表达、纯化与鉴定 将测序鉴定的 pET-28a(+)/*Mdctl* 重组质粒转化至 *E. coli* BL21/DE3 感受态细胞中, LB 平板(含卡那霉素 50 mg/L) 筛选阳性转化子,进行测序鉴定,鉴定正确的单菌落再次接种于 LB 液体培养基(含卡那霉素 50 mg/L) 中, 37 °C 200 r/min 振荡培养 12 h

后,以 1:50 接种于新鲜 LB 液体培养基(含卡那霉素 50 mg/L)中,37 °C 200 r/min 振荡培养至 OD₆₀₀ 值为 0.6 时,分别以不同浓度的 IPTG、温度和培养时间进行诱导表达。在离心重悬浓缩后的培养物中加入 5 × SDS 上样缓冲液,瞬时离心后煮沸 10 min,15% 的 SDS-PAGE 凝胶电泳分析 *Mdctl* 蛋白的表达,确定重组蛋白的最佳诱导条件。超声破碎诱导表达的菌体,分别取上清和沉淀进行 15% SDS-PAGE 凝胶电泳。按照蛋白纯化试剂盒说明书,纯化 *Mdctl* 重组蛋白,Western Blot 鉴定 *Mdctl* 纯化蛋白。

2 结果

2.1 生物信息学分析

Mdctl 基因 ORF 长为 333 bp,编码 110 个氨基酸(图 1)。*Mdctl* 蛋白的信号肽为 1 ~ 22 位氨基酸,判定其为分泌型蛋白(图 2)。*Mdctl* 蛋白理论

分子量为 13 131.42 Da,等电点约为 4.49。*Mdctl* 蛋白的 Clect 结构域为 23 ~ 110 位氨基酸,属于 C 型凝集素超家族(图 3)。

```

      10    20    30    40    50    60
1      ATGGCGGTTACTTGGCCTCTTTTGACAAATGACAGAAITTCAGGAAGTGCAGATCAT
1      M G G Y L A S F D N R Q E F Q E L S D H
      70    80    90   100   110   120
61     TTAGAGACTATTATCCACTGACAGATGGTGGATATCAGGATCTGATCAGATCA
21     L E D Y Y P T D R W W W I S G S D L H S
      130   140   150   160   170   180
121    GAGGTAATTTTTTATGGTACCGAAGTGGAAACAGTAAATATGCTGAATGGTCCCTT
41     E G N F Y W Y R T G K P V K Y A E W S L
      190   200   210   220   230   240
181    GGACAGCCTGATAATGCTGGAGGCAATGAGATTGTATGCAITTTATGGTACAGTATGAC
61     G Q P D N A G G N E D C M H L W Y S M Y
      250   260   270   280   290   300
241    AATACCGAATGAATGACTGGAAATGTAATATGGATGCAITTCAGATTTGGAGCCGAT
81     K Y R M N D W N C N M D A F Y I C E A D
      310   320   330
301    AGCCCGAAAACAGTCAATAGTTAGTTGTTTGA
101    S P K I V I V S S F *
  
```

注:图中黄色方框内为信号肽序列。

图 1 *Mdctl* 基因的开放阅读框及氨基酸序列
Fig. 1 ORF of *Mdctl* and its amino acid sequence

Signal sequence prediction with scores over 3.50

sequence from 1 to 110

Maximum score 4.8 at 23

Signal Sequence: MGGYLASFDNRQEFQELSDHLE

Mature Sequence: DYYPTDRWWWISGSDLHSEGNFYWYRTGKPKVYAEWVSLGQPDNAGGNEDCMHLWYSMYK YRMNDWNCNMDAFYICEAD
SPKIVIVSSF

No other score > 3.50

图 2 *Mdctl* 蛋白的信号肽分析

Fig. 2 Signal Peptide analysis of *Mdctl* protein

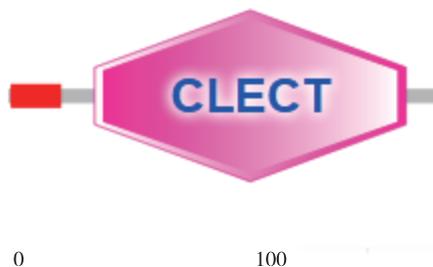


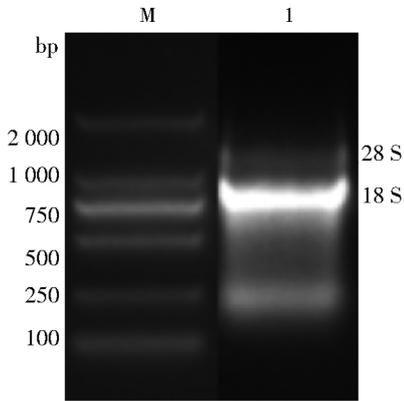
图 3 *Mdctl* 蛋白的功能结构域分析

Fig. 3 Conserved domain analysis of *Mdctl* protein

2.2 pMD19-T/*Mdctl* 克隆载体和 pET28a(+)/*Mdctl* 表达载体的构建

家蝇三龄幼虫总 RNA 电泳检测可见,18 S 条带较 28S 条带明亮清晰,28S 条带暗淡模糊,说明提取的总 RNA 无显著降解(图 4)。用 *Mdctl* 基因的克隆引物(CkF 和 CkR)对 pMD19-T/*Mdctl* 重组菌进行 PCR 扩增,电泳检测显示,其 PCR 产物在 333 bp 有一特异性条带,与预期的片段大小相一致,经测序鉴定表明 *Mdctl* 基因的克隆载体构建成功(图 5)。用 *Mdctl* 基因的表达引物(CbF 和 CbR)对 pET-28a(+)/*Mdctl* 重组菌进行 PCR 扩

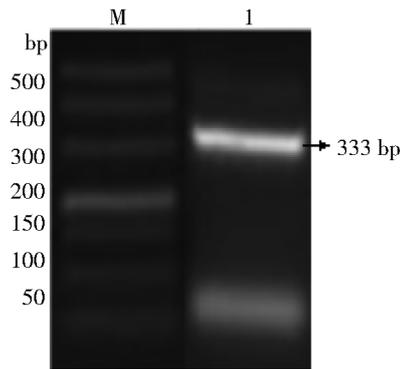
增,电泳显示,其 PCR 产物条带与理论值完全吻合,经测序鉴定表明 *Mdctl* 基因的表达载体构建成功(图 6)。



注:M 为 DNA 分子量标准,1 为家蝇三龄幼虫总 RNA。

图 4 总 RNA 的琼脂糖凝胶电泳

Fig. 4 Agarose gel electrophoresis of total RNA



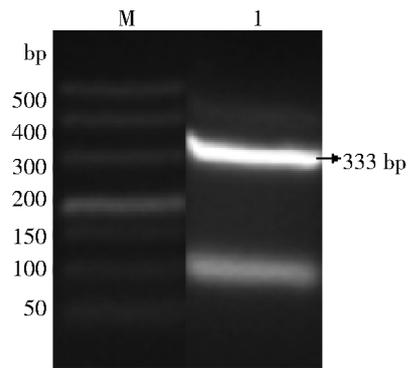
注:M 为 DNA 分子量标准,1 为 pMD19-T/*Mdctl* 重组菌落 PCR。

图 5 pMD19-T/*Mdctl* 重组菌落 PCR 的琼脂糖凝胶电泳

Fig. 5 Agarose gel electrophoresis of recombinant colony PCR product of pMD19-T/*Mdctl*

2.3 重组蛋白诱导表达、纯化与鉴定

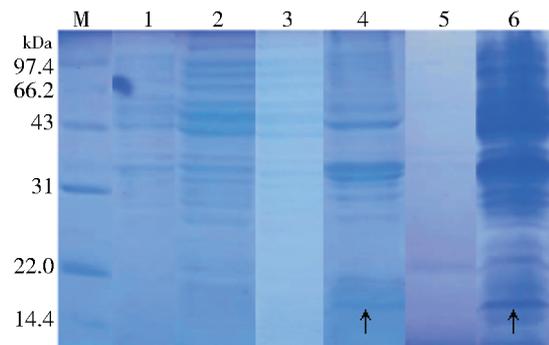
电泳结果显示,在 32 ℃,IPTG 终浓度为 0.6 mmol/L,诱导 18 h 时的蛋白表达量较高;*Mdctl* 重组蛋白主要存在于沉淀中,为包涵体表达,其分子量约为 16 kDa,与 *Mdctl* 蛋白两端融合 6 × His 标签后的总分子量相一致(图 7)。以小鼠来源的抗 His Tag 单克隆抗体(1:1 000)为一抗,羊抗小鼠 IgG-HRP(1:4 000)为二抗,进行 Western blot 鉴定 *Mdctl* 纯化蛋白,结果显示,*Mdctl* 纯化蛋白与抗 His Tag 单克隆抗体特异性结合,出现一明显免疫反应条带,分子量(约 16 kDa)正确,阴性对照在相应位置未出现该条带,进一步确认其为目的蛋白(图 8)。



注:M 为 DNA 分子量标准,1 为 pET-28a(+)/*Mdctl* 重组菌落 PCR。

图 6 pET-28a(+)/*Mdctl* 重组菌落 PCR 的琼脂糖凝胶电泳

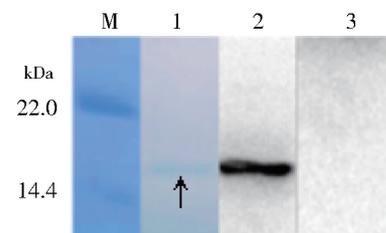
Fig. 6 Agarose gel electrophoresis of recombinant colony PCR product of pET-28a(+)/*Mdctl*



注:M 为 14.4 ~ 97.4 kDa 蛋白 Marker,1 为 pet28a(+)
空载未诱导,2 为 pet28a(+)
空载诱导,3 为 *Mdctl* 重组未诱导,4 为 *Mdctl* 重组诱导,5 为破碎后上清,6 为破碎后沉淀,箭头所示为 16 kDa 目的条带。

图 7 *Mdctl* 重组蛋白的诱导表达

Fig. 7 Induced expression of *Mdctl* recombinant protein



注:M 为蛋白分子量标准,1 为 *Mdctl* 纯化蛋白,2 为 *Mdctl* 纯化蛋白的 His 标签单抗检测,3 为阴性对照,箭头所示为目的条带。

图 8 *Mdctl* 纯化蛋白的鉴定

Fig. 8 Identification of purified *Mdctl* protein

3 讨论

家蝇具有极强的适应周围恶劣环境的能力,这缘于它强大的先天免疫^[1-4]。近年来,家蝇的先天免疫日益成为研究热点。课题组前期研究发现,白假丝酵母菌感染家蝇幼虫后可刺激 *Mdctl* 基因表达上调,认为该基因的表达产物在家蝇抗 *C. albicans* 感染过程中起作用^[5]。生物信息学分析显示,*Mdctl* 基因 ORF 全长 333 bp, 编码 110 个氨基酸,信号肽切割位点为 22~23 位氨基酸之间,是分泌型蛋白。*Mdctl* 的氨基酸序列中存在 Clect(C 型凝集素结构)结构域,为 23~110 位氨基酸,而且还有特异性结合甘露糖的 EPN/WND 氨基酸基序,因此它属于 C 型凝集素超家族,是一个新的家蝇 C 型凝集素。含有 Ca^{2+} 依赖型的碳水化合物识别结构域(CRD)的为经典 C 型凝集素,非 Ca^{2+} 依赖型的 C 型凝集素结构域(CTLD)的为非经典 C 型凝集素^[6]。C 型凝集素在抗感染免疫中的主要功能有:作为一种调理素,参与免疫识别和对病原体的凝集吞噬作用;介导细胞之间的黏附、迁移和细胞之间的相互作用;参与止血、凝固、物质运输及创伤修复等作用;引发凝集素补体途径的激活等^[6-8]。为后续研究 *Mdctl* 基因表达产物的生物学功能,需要获得足够的 *Mdctl* 蛋白,但家蝇体内的 *Mdctl* 蛋白含量少、分离提取困难、化学合成代价高,因此重组表达 *Mdctl* 蛋白是获取 *Mdctl* 基因表达产物的最有效途径。本研究通过构建大肠杆菌原核表达系统^[9-13],诱导表达家蝇 *Mdctl* 重组蛋白,分析得出,在 32 °C, IPTG 终浓度为 0.6 mmol/L,诱导时间 18 h 时, *Mdctl* 重组蛋白表达量较高。*Mdctl* 重组蛋白主要存在于沉淀中,为包涵体表达。经 Western-Blot 鉴定, *Mdctl* 纯化蛋白确实为目标蛋白。

鉴于目前家蝇凝集素的分子鉴定^[14-17]和家蝇体内的免疫调节功能^[18-24]报道甚少, *Mdctl* 作为家蝇体内一种新的凝集素基因,在白假丝酵母菌刺激家蝇三龄幼虫后高表达,本研究将进一步开展它对家蝇先天免疫调节作用的研究。

4 参考文献

[1] 杨尉锦, 国果, 吴沁怡, 等. 家蝇几丁质酶基因 *MDC II* 重组表达质粒的构建及表达模式研究[J]. 生物技术通报, 2017, 33(2): 102-108.

[2] 胡红元, 任春丽, 尚小丽, 等. 家蝇 *GAPDH* 基因的克隆、表达及作为内参的可靠性分析[J]. 中国病原生物学杂志, 2016, 111(3): 250-256.

[3] 陶如玉, 李妍, 马慧玲, 等. 家蝇 *AMP17* 基因的克隆及其分子特性和表达模式研究[J]. 中国病原生物学杂志, 2017, 1131(11): 1079-1083.

[4] 张姝, 胡蓉, 黄健, 等. 家蝇 β -葡萄糖苷酶基因的克隆及重组表达[J]. 环境昆虫学报, 2017, 39(4): 930-939.

[5] XIU J F, WANG T, WANG Y, et al. Histological observation and expression patterns of antimicrobial peptides during fungal infection in *musca domestica* (diptera: muscidae) larvae [J]. Brazilian Archives of Biology and Technology, 2016, 147(16): 1678-1690.

[6] XIA X, YOU M, RAO X J, et al. Insect C-type lectins in innate immunity [J]. Developmental & Comparative Immunology, 2017, 83(11): 70-79.

[7] RICHARDSON M B, WILLIAMS S J. MCL and mincle: c-type lectin receptors that sense damaged self and pathogen-associated molecular patterns [J]. Frontiers in Immunology, 2014, 288(5): 1-9.

[8] CARLOS D F, SALVADOR I, PAULA S L, et al. Flexible signaling of myeloid c-type lectin receptors in immunity and inflammation [J]. Frontiers in Immunology, 2018, 9(4): 1-13.

[9] 张树军, 狄建军, 张国文. 大肠杆菌 *yfiF* 基因原核表达系统构建、表达条件优化及蛋白纯化[J]. 生物技术, 2016, 26(3): 229-233.

[10] 王静, 杜江, 周细中, 等. 肺表面活性物质相关蛋白 C 原核表达载体的构建、表达及纯化[J]. 中国组织工程研究, 2012, 16(15): 2699-2703.

[11] 朱若林, 沈娇娇, 蒋书东, 等. 鱼类病毒性出血性败血症病毒基质蛋白的原核表达及其亚细胞定位[J]. 中国水产科学, 2019, 26(1): 216-222.

[12] 伍娜娜, 荣娜, 康超, 等. 重组铜绿假单胞菌外膜蛋白 D 的原核表达与多克隆抗体制备研究[J]. 河北农业大学学报, 2019, 42(1): 103-109.

[13] 李红欢, 钱凌霄, 李庆辉, 等. 单增李斯特菌 *lmo2193* 基因克隆与原核表达[J]. 畜牧与兽医, 2019, 51(2): 109-112.

[14] CAO X, ZHOU M, WANG C, et al. Immunomodulatory effect of lectin from *Musca domestica pupa* on immunosuppressive mice: Effect of lectin on immunosuppressive mice [C]. International Conference on Human Health & Biomedical Engineering, 2011.

[15] CAO X, SUN Y, WANG C, et al. Purification and characterization of a new d-galactose-specific lectin from the housefly *musca domestica*, and its antiproliferative effect

- on human k562 and mcf-7 tumor cells[J]. *Journal of Insect Science*, 2010, 10(79): 1–12.
- [16] CAO X, XU C, ZENG B, et al. Immunomodulation activity of lectin isolated from *musca domestica* (housefly) pupae [J]. *Natural Product Research & Development*, 2010, 22(2): 1–6.
- [17] ZHAO Q, CAO X, ZENG B, et al. *Musca domestica* larva lectin induces apoptosis in bel-7402 cells through a mitochondria-mediated reactive oxygen species way [J]. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 2010, 33(8): 1274–1278.
- [18] CAO X, HUO Z, LU M, et al. Purification of lectin from larvae of the fly, *musca domestica*, and in vitro anti-tumor activity in mcf-7 cells [J]. *Journal of Insect Science*, 2010, 10(164): 164–176.
- [19] CAO X, ZHOU M, WANG C, et al. Lectin purified from *Musca domestica* pupa up-regulates NO and iNOS production via TLR4/NF- κ B signaling pathway in macrophages [J]. *International Immunopharmacology*, 2011, 11(4): 399–405.
- [20] CAO X, ZHOU M, WANG S, et al. Inhibition on hepatitis B virus in vitro of lectin from *Musca domestica* pupa via the activation of NF- κ B [J]. *Virus Research*, 2012, 170(1–2): 53–58.
- [21] NIE J, CAO X, ZHOU M, et al. *Musca domestica* pupae lectin induces apoptosis in HepG2 cells through a NF- κ B/p65-mediated caspase pathway [J]. *Bulletin Du Cancer*, 2012, 99(4): E49–E54.
- [22] ZHANG R, CAO X, WANG C, et al. An antitumor peptide from *Musca domestica* pupae (MATP) induces apoptosis in HepG2 cells through a JNK-mediated and Akt-mediated NF- κ B pathway [J]. *Anti-cancer Drugs*, 2012, 23(8): 827–835.
- [23] WANG C L, XIA Y, NIE J Z, et al. *Musca Domestica* larva lectin induces apoptosis in bel-7402 cells through a ca2+/jnk-mediated mitochondrial pathway [J]. *Cell Biochemistry and Biophysics*, 2013, 66(2): 319–329.
- [24] XIAOHONG C, MINGHUI Z, CHUNLING W, et al. *Musca domestica* pupae lectin improves the immunomodulatory activity of macrophages by activating nuclear factor NF- κ B [J]. *Journal of Medicinal Food*, 2012, 15(2): 145–151.

(2019-11-23 收稿, 2020-01-25 修回)

中文编辑: 刘平; 英文编辑: 张启芳

(上接第 137 页)

- [22] LI J, WANG J Y, YUE H R, et al. SNAI2 3'untranslated region promotes the invasion of ovarian cancer cells by inducing MARCKS expression [J]. *Cancer*, 2019, 10: 2480–2487.
- [23] WU Y J, HU Z L, HU S D, et al. Glutamate dehydrogenase inhibits tumor growth in gastric cancer through the Notch signaling pathway [J]. *Cancer Biomark*, 2019, 26: 303–312.
- [24] CHUNG W C, ZHOU Y Y, ATFI A, et al. Downregulation of notch signaling in kras-induced gastric metaplasia [J]. *Neoplasia*, 2019, 21(8): 810–821.
- [25] HIBDON E S, RAZUMILAVA N, KEELEY T M, et al. Notch and mTOR signaling pathways promote human gastric cancer cell proliferation [J]. *Neoplasia*, 2019, 21(7): 702–712.
- [26] LI W, WANG D, SUN X, et al. ADAM17 promotes lymph node metastasis in gastric cancer via activation of the Notch and Wnt signaling pathways [J]. *International Journal of Molecular Medicine*, 2019, 43(2): 914–926.

(2019-12-13 收稿, 2020-01-25 修回)

中文编辑: 严征; 英文编辑: 张启芳