

# shRNA介导DEPDC7基因沉默对肝癌HepG2细胞增殖、侵袭及迁移能力影响的研究

廖之君<sup>1\*</sup> 王心睿<sup>1</sup> 杨红<sup>1</sup> 曾也婷<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>福建医科大学生物化学与分子生物学系, 福州 350108;

<sup>2</sup>福建医科大学基础医学院病理学系肿瘤研究室, 福州 350108)

**摘要** 功能未知基因DEPDC7(DEP domain containing 7)是从基因芯片数据挖掘得到的, 基因表达谱提示只在肝组织中选择性高表达, 但是关于DEPDC7在肝癌细胞内参与的生命活动及其分子机制的相关研究报道较少。该研究应用RNAi技术构建DEPDC7慢病毒载体并感染人肝癌细胞株HepG2, 利用RT-qPCR和Western blot方法检测DEPDC7干扰效果。运用噻唑蓝(MTT)比色法和克隆形成方法检测细胞增殖能力, 流式细胞术检测细胞周期变化, Transwell小室检测细胞侵袭迁移能力。结果显示, 成功构建的DEPDC7慢病毒载体可以有效干扰DEPDC7 mRNA和蛋白的表达( $P<0.05$ )。此外, DEPDC7被沉默后, 可以有效促进细胞周期从G<sub>1</sub>期向S期转变, 细胞增殖和侵袭迁移能力均显著提高( $P<0.05$ )。该研究提示, 肝癌细胞HepG2中DEPDC7低表达能有效提高细胞增殖、克隆形成和侵袭迁移能力, 为后续研究DEPDC7转录调控机制等指明了方向。

**关键词** DEPDC7; RNA干扰; 肝癌; 增殖; 迁移; 侵袭

## Effects of shRNA-mediated Knockdown of DEPDC7 on Proliferation, Migration and Invasion of Human Hepatoma Cell HepG2

Liao Zhijun<sup>1\*</sup>, Wang Xinrui<sup>1</sup>, Yang Hong<sup>1</sup>, Zeng Yeting<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>Department of Biochemistry and Molecular Biology, Fujian Medical University, Fuzhou 350108, China; <sup>2</sup>Department of Pathology and Institute of Oncology, School of Basic Medical Sciences, Fujian Medical University, Fuzhou 350108, China)

**Abstract** Function-unknown gene DEPDC7 (DEP domain containing 7) was obtained by gene chip data mining with highly selective expression in liver tissue. However, its role and molecular mechanism in hepatic cellular carcinoma are still unclear. In this study, we utilized liver cancer cell line HepG2 to construct DEPDC7 knockdown cell strain by RNAi. Moreover, we analyzed the mRNA and protein expression levels of DEPDC7 by RT-qPCR and Western blot. Cell proliferation and cell cycle were analyzed by methyl thiazol tetrazolium (MTT), colony formation experiment and flow cytometry (FACS). Cell motility and invasiveness were assayed by Matrigel migration and invasion assay. The results showed that DEPDC7-shRNA effectively inhibited the expression of DEPDC7 at both mRNA and protein levels ( $P<0.05$ ). Knockdown of DEPDC7 led to increased proliferation, migration and invasion ( $P<0.05$ ). Our results suggested that shRNA-mediated knockdown of DEPDC7 significantly promoted cell proliferation, colony formation, migration and invasion. Moreover, this research pointed out the direction of future research

收稿日期: 2015-01-12 接受日期: 2015-05-11

福建省科技厅青年科技人才基金(批准号: 2008F3045)资助的课题

\*通讯作者。Tel: 0591-22862007, E-mail: liaozj100@163.com

Received: January 12, 2015 Accepted: May 11, 2015

This work was supported by the Fujian Provincial Department of Science & Technology (Grant No.2008F3045)

\*Corresponding author. Tel: +86-591-22862007, E-mail: liaozj100@163.com

网络出版时间: 2015-07-06 14:02 URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20150706.1402.004.html>

on the mechanism of transcription and regulation of *DEPDC7*.

**Keywords** *DEPDC7*; RNA interference; liver cancer; cell proliferation; migration; invasion

功能未知基因*DEPDC7*(DEP domain containing 7)是前期从3 800多个组织样品基因芯片数据中挖掘得到的<sup>[1]</sup>。GEO数据库和EST数据库的芯片数据显示其在肝组织中选择性高表达<sup>[2]</sup>;同时, Northern blot和Western blot分析结果显示, 人*DEPDC7*在正常肝组织(肝细胞L-02)中高表达, 在癌组织(HepG2、Huh7、SMC-7721等肝癌细胞)中低表达<sup>[3-4]</sup>。然而, 该基因的生物功能和在细胞内的分子机制却鲜有报道。*DEPDC7*含有高度保守的DEP结构域, 我们通过构建含未知基因的肝组织选择性细胞通讯(Liver Selective Cell Communication, LSCC)基因网络, 并应用文献挖掘、KEGG通路和保守结构域等分析方法, 推测*DEPDC7*基因产物可能具有信号转导和细胞锚定等作用<sup>[5]</sup>。整合已发表的研究成果, 进一步揭示出*DEPDC7*基因产物有可能参与了肝癌的发生、发展过程。

为探明*DEPDC7*在肝癌的发生、发展及转移过程中潜在的生物学功能, 本研究应用RNAi技术, 通过构建慢病毒重组载体并特异性干扰*DEPDC7*在人肝癌细胞HepG2中的表达, 检测其对肝癌HepG2细胞增殖、迁移及侵袭的影响, 为后续深入探索*DEPDC7*在肝癌发生发展过程中的作用及分子机制奠定实验基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

人肝癌细胞株HepG2和293T细胞由福建医科大学转化医学研究院保存。菌株stable-3、pHelper(pMDLg、pRSV-REV和pVSV-G)载体和表达载体pLV-H1-EF1 $\alpha$ -puro由厦门大学韩家淮教授馈赠。DEME培养液和小牛血清购自Hyclone公司。Trizol和Lipofectamine<sup>TM</sup> 3000转染试剂购自Invitrogen公司。RIPA蛋白裂解液、PMSF和ECL发光液购自碧云天生物技术公司。BamH I限制性内切酶购自Fermentas公司。反转录试剂盒PrimeScript<sup>TM</sup> RT Reagent Kit购自TaKaRa公司。SYBER Green qPCR Supermix(ROX)荧光定量PCR试剂盒购自Roche公司。鼠抗人 $\beta$ -actin多克隆抗体和HRP标记的羊抗鼠二抗购自Cell Signaling公司, 鼠抗人*DEPDC7*多克隆抗体购自Abcam公司。6孔、12孔、96孔细胞培养板、

Transwell小室(8  $\mu$ m)和基质胶均购自Corning公司。shRNA序列由上海生工生物工程有限公司合成。

### 1.2 *DEPDC7* shRNA慢病毒载体的构建

以*DEPDC7*的CDS区为模板, 通过在线软件(<http://maidesigner.lifetechnologies.com/>)设计*DEPDC7*干扰序列, 之后将选取的shRNA通过Blast进行同源序列比对以避免非特异性干扰。特异性shRNA序列为: 5'-GGT CAA CAG CAG TAA CTA TCT-3'; 阴性对照的序列: 5'-GCC ACA ACG TCT ATA TCA T-3'。确定*DEPDC7*发夹序列寡核苷酸链序列为: 正义链: 5'-AAA AGG TCA ACA GCA GTA ACT ATT TGG ATC CAA ATA GTT ACT GCT GTT GAC C-3', 反义链: 5'-GGT CAA CAG CAG TAA CTA TTT GGA TCC AAA TAG TTA CTG CTG TTG ACC TTT T-3'; 阴性对照发夹序列寡核苷酸链序列为: 正义链: 5'-AAA AGC CAC AAC GTC TAT ATC ATT TGG ATC CAA ATG ATA TAG ACG TTG TGG C-3', 反义链: 5'-GCC ACA ACG TCT ATA TCA TTT GGA TCC AAA TGA TAT AGA CGT TGT GGC TTT T-3', 退火形成双链并连入经BamH I酶切后的pLV-H1-EF1 $\alpha$ -puro载体<sup>[6]</sup>。转化大肠杆菌stable-3感受态细胞, 挑选多个单克隆进行酶切鉴定及DNA测序, 鉴定阳性克隆。将构建成功的慢病毒重组质粒分别命名为DEPDC7-Negative Control(NC)和DEPDC7-RNAi(RNAi)。

### 1.3 慢病毒包装及感染HepG2细胞

将构建好的DEPDC7-NC和DEPDC7-RNAi重组质粒以及pHelper包装质粒按Lipofectamine 3000使用说明共转染293T细胞, 转染后8 h换为完全培养基。培养48 h后, 收集富含病毒颗粒的细胞上清液。实验设立NC组和RNAi组。取对数生长期的HepG2细胞, 以 $1 \times 10^5$ /孔的细胞量接种到12孔板, 于37  $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub>培养箱中过夜培养。待细胞融合度达到约30%~40%后, 加入慢病毒颗粒感染HepG2细胞, 同时每孔加入7  $\mu$ g/mL polybrene, 12 h后换为正常培养基, 感染48~72 h后, 镜下观察GFP表达情况。待细胞感染率达到90%~100%后, 收集细胞进行下游实验。如果感染效率无法达到90%以上, 则加入嘌呤霉素进行筛选, 以确保足够的敲低效率。慢病毒包装及感染HepG2细胞分别进行3次独立实验。

#### 1.4 RT-qPCR检测DEPDC7 mRNA水平表达

按照TRIzol Reagent说明书提取细胞总RNA, 并将所得RNA溶解于RNase处理过的水中。依据Prime-Script™ RT Reagent Kit说明书各取1 μg总RNA作为反转录模板, 产物cDNA采用荧光试剂SYBER Green qPCR Supermix进行定量PCR检测。其中, DEPDC7基因的引物为: 正义链: 5'-ACC TTC CAC TTC TTG ACT CCT TAC-3', 反义链: 5'-CGA GAG CCA CTC ATC TTC CTG-3'。内参β-actin基因的引物为: 正义链: 5'-CGT GCG TGA CAT TAA GGA GAA G-3', 反义链: 5'-GGA AGG AAG GCT GGA AGA GTG-3'。反转录的cDNA产物稀释10倍作为模板, 每组样品设置3个复孔, 取平均值。反应体系为10 μL, 采用两步法反应, 扩增条件为: 95 °C预变性10 min; 95 °C变性15 s, 60 °C退火1 min, 共40个循环。实验过程及数据储存与分析均由美国ABI公司Step One™ Real-time PCR system完成, 采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法分析定量PCR结果。

#### 1.5 Western blot检测DEPDC7蛋白水平表达

收集对数生长期的细胞, 按照RIPA裂解液说明书提取总蛋白, 并用BCA法定量蛋白浓度。加入5× Protein Loading Buffer, 煮沸10 min。根据β-actin调整上样量(30 μg上样量), 进行10%聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)。以湿转法将蛋白转移至PVDF膜上, 用含10%脱脂奶粉室温封闭2 h, 孵育鼠抗人β-actin多克隆抗体(1:8 000稀释)和鼠抗人DEPDC7多克隆抗体(1:1 000稀释), 4 °C摇床孵育过夜, TBST洗膜3次, 每次10 min。将洗过的膜置于HRP标记羊抗兔二抗稀释液(1:10 000稀释), 室温孵育2 h后, TBST洗膜3次, 每次10 min。加入ECL发光液, 置于ImageQuant LAS 4000 mini Imaging System仪器中曝光。采用Quantity One软件分析比较各组灰度值, 并作进一步统计分析。

#### 1.6 MTT法检测细胞增殖

收集对数生长期HepG2细胞(NC组和RNAi组), 按照3 000/孔的细胞量接种于96孔板。每组6个复孔, 另设1个空白对照孔, 终体积200 μL。培养24 h后, 每孔加入20 μL MTT, 37 °C避光培养4 h, 吸尽孔内上清液, 加入DMSO 150 μL, 避光振荡15 min 甲臞完全溶解, 酶标仪读取570 nm吸光度值, 计算平均值。重复以上步骤, 连续测定7 d。以吸光度值为纵坐标, 培养时间为横坐标绘制细胞增殖曲线。

#### 1.7 平板克隆法检测克隆形成能力

收集对数生长期HepG2细胞(NC组和RNAi组),

按照500/孔的细胞量接种到6孔板, 使单个细胞分散均匀, 置于细胞培养箱内培养。每隔2 d换1次细胞培养液, 当细胞形成肉眼可见的克隆时, 终止培养, PBS清洗细胞, 10%甲醛固定30 min, 0.1%结晶紫进行染色并拍照计算克隆数和克隆形成率[(克隆数/接种细胞数)×100%]。

#### 1.8 流式细胞术检测细胞周期

将用于细胞周期检测实验的HepG2细胞(NC组和RNAi组)用无血清培养液饥饿培养12 h, 使细胞周期同步在G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>期。然后改用含10%小牛血清的培养基继续培养。36 h后用0.25%胰酶消化后装入离心管低速离心5 min(1 000 r/min), 用灭菌PBS清洗3次, 每次5 min。弃去上清液, 加入预冷70%乙醇, 4 °C过夜固定。1 000 r/min离心5 min, 弃上清, 预冷的PBS清洗3次, 每次5 min。避光加入PI染料, 4 °C避光染色30 min, 上机检测。实验重复3次。

#### 1.9 Transwell小室法检测细胞的侵袭、迁移能力

将Transwell小室置于24孔板中。同时将100 μL Matrigel(BD)使用无血清DMEM培养液按照1:6比例稀释, 取60 μL稀释液均匀铺到Transwell小室上室, 放入细胞培养箱6 h。从培养箱取出小室, 上室加入100 μL无血清DMEM培养液水化30 min。对数生长期HepG2细胞(NC组和RNAi组)用胰酶消化后, 浓度调至4×10<sup>5</sup>/mL, 取100 μL加到上室, 下室加入600 μL含15%小牛血清的DMEM培养液, 置于37 °C细胞培养箱中。24 h后弃去培养基。取出小室, PBS洗3次后用10%甲醛固定30 min, 0.1%结晶紫染色10 min, 用棉签擦去Matrigel胶和微孔膜上层细胞。100倍光学显微镜下随机取8~10个视野拍照并计算穿膜细胞数量。以上为侵袭能力检测, 而迁移实验操作与侵袭基本相同, 不同之处在于小室上室未铺Matrigel, 上室加入1×10<sup>4</sup>细胞。实验重复3次。

#### 1.10 数据统计

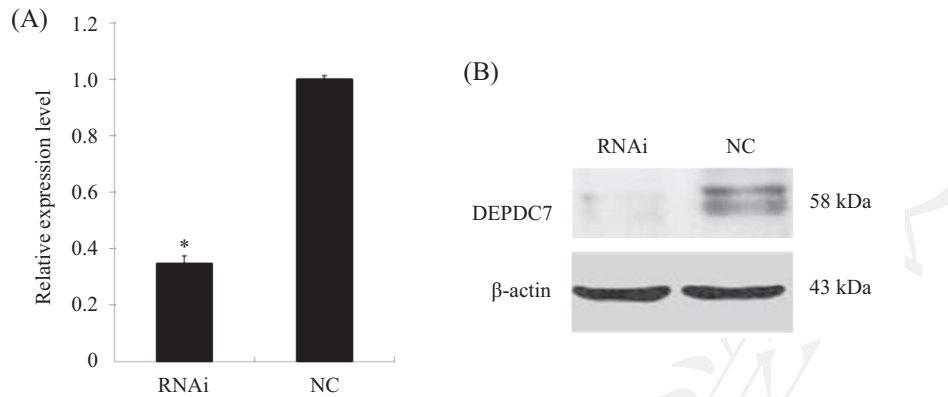
每组实验设立3个重复, 结果以mean±S.D.表示, 实验组和对照组间比较使用SPSS 22.0软件进行独立样本t检验, P<0.05表示差异显著。

## 2 结果

### 2.1 RT-qPCR和Western blot方法检测DEPDC7沉默效果

构建的慢病毒重组载体DEPDC7-NC(NC)、DEPDC7-RNAi(RNAi)经酶切鉴定和测序确认无误,





A: RT-qPCR检测DEPDC7 mRNA转录水平(\* $P < 0.05$ , 与NC组比较); B: Western blot检测DEPDC7蛋白质表达。

A: the expression of DEPDC7 mRNA in different groups analyzed by RT-qPCR (\* $P < 0.05$  compared with NC group); B: the expression of DEPDC7 protein in different groups analyzed by Western blot.

图1 shRNA沉默肝癌细胞株DEPDC7基因的验证结果

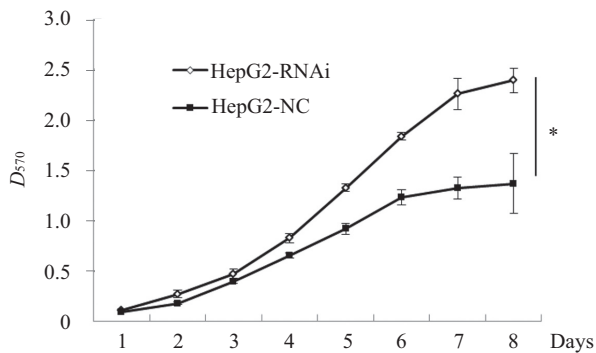
Fig.1 The demonstrated results of shRNA-mediated knockdown of DEPDC7 in HepG2 cell

包装慢病毒并感染HepG2细胞。将稳定表达的细胞接种于12孔板,待细胞汇合度达到90%时,收集细胞并提取总RNA和总蛋白,通过RT-qPCR技术和West-

ern blot检测DEPDC7在mRNA和蛋白表达水平。结果显示, RNAi组中DEPDC7的mRNA转录水平显著下降,与NC阴性对照组相比下调60%(图1A); RNAi组中DEPDC7蛋白水平显著下降,与NC阴性对照组相比明显降低(图1B),表明细胞中内源性DEPDC7的表达得到有效干扰,可用于下一步的细胞功能分析。

## 2.2 DEPDC7表达下调促进HepG2细胞增殖

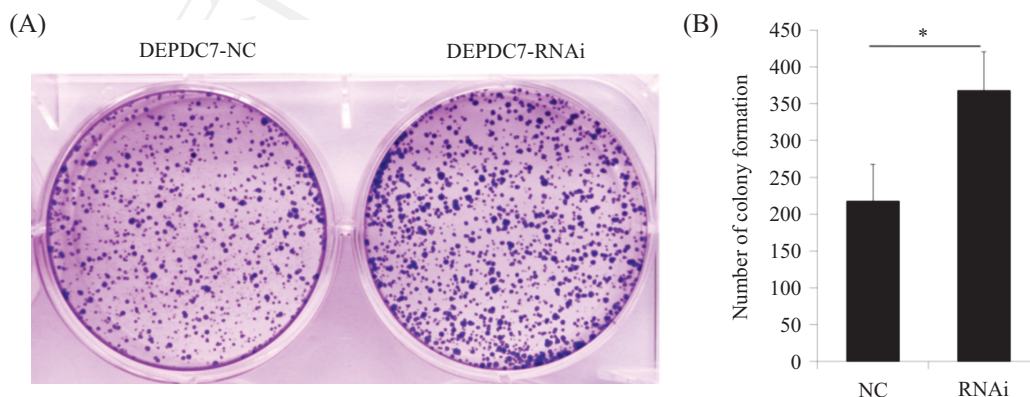
采用MTT方法检测DEPDC7表达下调与HepG2细胞增殖的关系。结果显示,与对照组(NC)HepG2细胞相比,实验组(RNAi)DEPDC7表达下调后,细胞增殖能力明显增强,其中,从第3~5 d差异开始明显( $P < 0.05$ )。同时, RNAi组细胞的细胞倍增时间明显增加, NC组在实验进行第5 d已经开始进入平稳期,而RNAi组在第6 d有进入平稳期的迹象(图2)。



\* $P < 0.05$ .

图2 DEPDC7表达下调对HepG2细胞增殖的影响

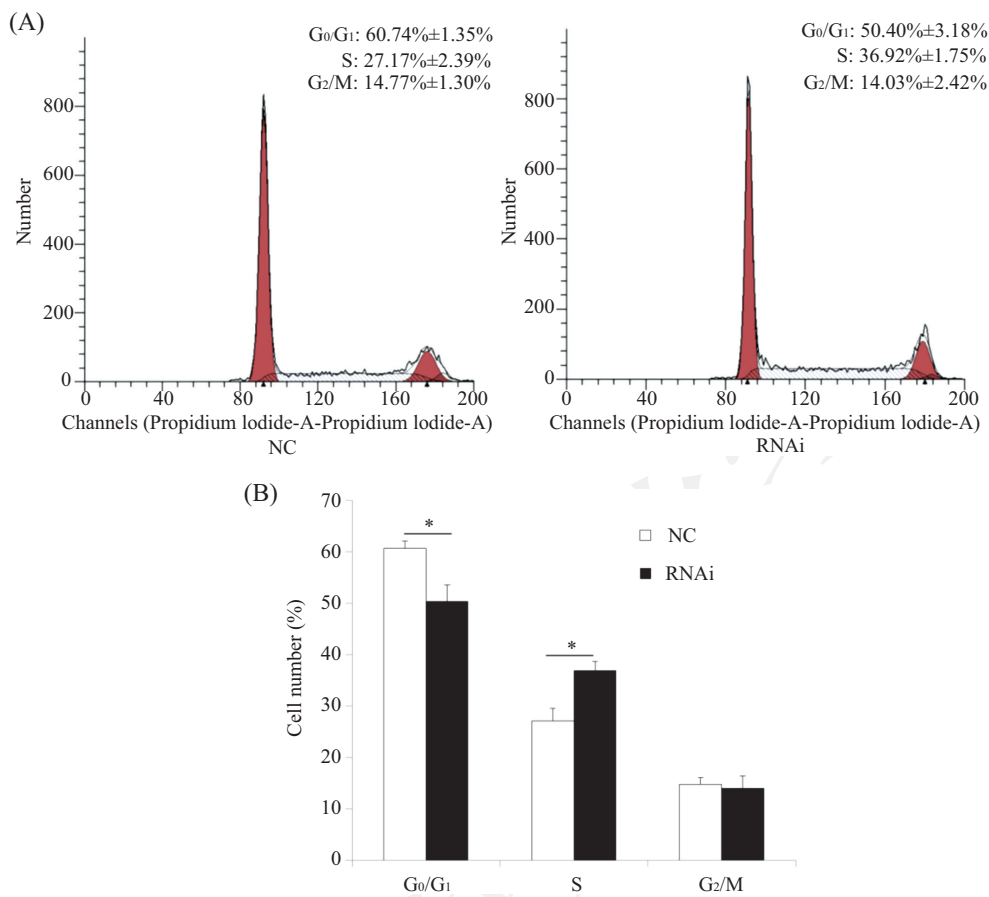
Fig.2 Effects of DEPDC7 down-regulation on HepG2 cell proliferation



\* $P < 0.05$ .

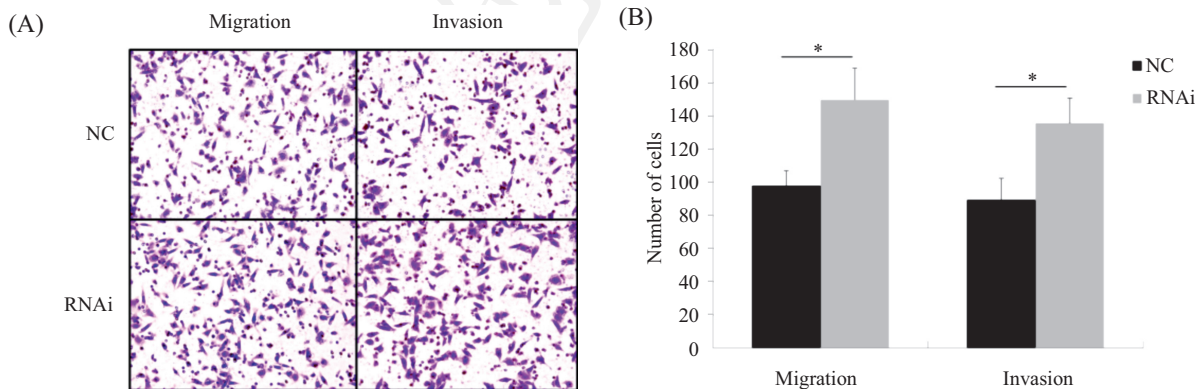
图3 DEPDC7表达下调对HepG2细胞克隆形成能力的影响

Fig.3 Effects of DEPDC7 down-regulation on HepG2 cell colony formation



\*P<0.05.

图4 DEPDC7表达下调对HepG2细胞克隆形成能力的影响  
Fig.4 Effects of DEPDC7 down-regulation on HepG2 cell colony formation



\*P<0.05.

图5 DEPDC7表达下调对HepG2细胞侵袭迁移能力的影响(100×)  
Fig.5 Effects of DEPDC7 down-regulation on HepG2 cell invasion and migration (100×)

### 2.3 DEPDC7表达下调对HepG2细胞克隆形成能力的影响

采用平板克隆方法检测DEPDC7表达下调对HepG2细胞克隆形成能力的影响。结果表明, RNAi组细胞克隆量数为368±52, 显著高于NC组的218±49。同时可以得出, 实验组(RNAi)的克隆形成

率、细胞克隆数量及克隆团的大小均明显高于对照组(图3, P<0.05)。这一结果表明, 干扰DEPDC7表达有效促进了肝癌细胞HepG2增殖和克隆形成能力。

### 2.4 DEPDC7表达下调对HepG2细胞周期的影响

采用流式细胞术方法检测各组细胞的细胞周期变化, 分析DEPDC7表达下调与HepG2细胞周期

的关系。最终拟合结果显示,与对照组(NC)细胞相比,实验组(RNAi)细胞的G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>期细胞比例减少,而S期细胞比例显著增加( $P < 0.05$ ),但G<sub>2</sub>/M期细胞比例无显著变化(图4)。

## 2.5 DEPDC7表达下调对HepG2细胞迁移和侵袭能力的影响

采用Transwell方法检测DEPDC7表达下调与HepG2细胞侵袭迁移的关系。结晶紫染色后,对照组(NC)和实验组(RNAi)均有细胞穿过小室滤膜。其中,DEPDC7表达下调后,穿膜细胞数明显增多。迁移实验中培养24 h后,RNAi组跨膜数为150±19,显著高于NC组(98±9)( $P < 0.05$ );侵袭实验中培养48 h后,RNAi组跨膜数为136±15,显著高于NC组(90±13)( $P < 0.05$ )(图5)。结果表明,干扰DEPDC7表达可以有效提高HepG2细胞的侵袭迁移能力。

## 3 讨论

全球范围内,肝癌死亡率位居癌症死亡率第三位;在西方国家中,肝癌发生率逐年升高<sup>[7]</sup>。全球每年约有50万人患肝癌,其中一半发生在中国<sup>[8]</sup>。近几年,针对肝癌细胞生物学和分子信号转导系统的各项研究已经证实,肝癌的发生发展是一个受内外环境多种因素影响、多基因突变、多阶段演进的复杂过程,同时许多干预肝癌发生、发展的潜在靶点被相继发现。在之前的研究中,我们实验室已经通过含未知基因的肝组织选择性细胞通讯(LSCC)基因网络挖掘出大量肝组织选择性表达的基因和肝癌治疗的潜在靶点<sup>[1]</sup>,其中包含本文的研究对象DEPDC7。

人DEPDC7位于11号染色体11p13,存在两个mRNA转录本,其表达产物含有两个结构域,DEP结构域和GAP结构域。DEP结构域是一个接近100个氨基酸组成的蛋白模序,Ponting等<sup>[9]</sup>于1996年首次在新杆状线虫和哺乳动物细胞中的Dishevelled、EGL-10和Pleckstrin三种蛋白中将这个保守序列明确定义。通过文献挖掘发现,DEP结构域在许多信号蛋白中都有存在,并参与介导了信号转导、细胞极性确立、小分子信号激活等生命过程。现有研究表明,在Wnt信号通路和GPCR信号转导中,均发现DEP结构域存在重要意义<sup>[10-11]</sup>。DEPDC7含有高度保守的DEP结构域,同时其基因产物在正常肝组织(肝细胞)和肝癌组织(肝癌细胞)中的表达具有显著差异,推测DEPDC7很有可能参与调控了真核

生物体内的重要生命过程。

为了明确DEPDC7在肝癌细胞中的作用,本研究利用RNAi技术干扰细胞内DEPDC7的表达,进一步探讨了DEPDC7与人肝癌细胞HepG2的功能相关性。结果显示,成功沉默人肝癌细胞HepG2中DEPDC7内源性表达后,细胞增殖能力和侵袭迁移能力均明显提高。此外,通过流式细胞检测DEPDC7沉默对HepG2细胞周期的影响,结果表明,DEPDC7表达下调可以改变HepG2细胞周期时相分布,有效促进细胞周期从G<sub>1</sub>期到S期的转变。大量实验证据表明,NF-κB(nuclear factor-κB)信号通路的持续激活与肿瘤密切相关,在肝癌发生发展中,NF-κB表达水平明显高于癌旁组织<sup>[12]</sup>。D'Andrea等<sup>[13]</sup>发现,DEPDC7可以诱导NF-κB。这些证据均与我们的研究结果相符合。由此说明,DEPDC7参与了肝癌细胞增殖侵袭的调节过程。但是在这些生物学功能中,DEPDC7具体是如何调节细胞增殖和侵袭迁移能力,与哪些细胞周期蛋白相互作用,我们所感兴趣的DEP结构域在其中有何关键作用等问题还需要后续实验进行验证和阐明。

综上所述,我们构建并鉴定了靶向干扰DEPDC7的肝癌HepG2细胞株,证明了DEPDC7沉默后可以明显促进肝癌细胞增殖、克隆形成和侵袭迁移的能力。同时,也为后续研究DEPDC7转录调控机制等指明了方向。

## 参考文献 (References)

- 1 Liang S, Li Y, Be X, Howes S, Liu W. Detecting and profiling tissue-selective genes. *Physiol Genomics* 2006; 26(2): 158-62.
- 2 Liao ZJ, Ma WL, Liang S, Meng W, Shang T, Zheng WL. Transcriptional regulation of genes involved in liver selective cells communication. *J South Med Univ* 2008; 28(9): 1582-5.
- 3 Sancho RM, Law BM, Harvey K. Mutations in the LRRK2 Roc-COR tandem domain link Parkinson's disease to Wnt signalling pathways. *Hum Mol Genet* 2009; 18(20): 3955-68.
- 4 廖之君, 王晓江, 王心睿, 林德馨. DEPDC7基因在肝细胞及肿瘤细胞中的差异性表达. *热带医学杂志(Liao Zhijun, Wang Xiaojiang, Wang Xinrui, Lin Dexin. The differential expression of DEPDC7 in hepatic cells and neoplastic cells. Journal of Tropical Medicine)* 2012; 12(12): 1438-41.
- 5 廖之君, 马文丽, 梁爽, 林德馨, 王晓江, 郑文岭. 肝选择性未知基因loc91614的功能预测及表达研究. *实用医学杂志(Liao Zhijun, Ma Wenli, Liang Shuang, Lin Dexin, Wang Xiaojiang, Zheng Wenling. Bioinformatical prediction and gene expression of liver-selective unknown gene loc91614. The Journal of Practical Medicine)* 2013; 29(15): 2447-50.
- 6 Li L, Chen W, Liang Y, Ma H, Li W, Zhou Z, *et al.* The Gβγ-Src

- signaling pathway regulates TNF-induced necroptosis via control of necrosome translocation. *Cell Res* 2014; 24(4): 417-32.
- 7 Ferenci P, Fried M, Labrecque D, Bruix J, Sherman M, Omata M, *et al.* Hepatocellular carcinoma (HCC): A global perspective. *J Clin Gastroenterol* 2010, 44(4): 239-45.
- 8 吴孟超. 原发性肝癌在中国的治疗和研究现状. 成都医学院学报(Wu Mengchao. Therapy and current research status in primary liver cancer in China. *Journal of Chengdu Medical College*) 2012; 7(2): 161-2.
- 9 Ponting CP, Bork P. Pleckstrin's repeat performance: A novel domain in G-protein signaling. *Trends Biochem Sci* 1996; 21(7): 245-6.
- 10 Xu W, He X. DEEP insights through the DEP domain. *Structure* 2010; 18(10): 1223-5.
- 11 Tauriello DV, Jordens I, Kirchner K, Slootstra JW, Kruitwagen T, Bouwman BA, *et al.* Wnt/ $\beta$ -catenin signaling requires interaction of the dishevelled DEP domain and C terminus with a discontinuous motif in Frizzled. *Proc Natl Acad Sci USA* 2012; 109(14): E812-20.
- 12 He G, Karin M. NF- $\kappa$ B and STAT3-key players in liver inflammation and cancer. *Cell Res* 2011; 21(1): 159-68.
- 13 D'Andrea EL, Ferravante A, Scudiero I, Zotti T, Reale C, Pizzulo M, *et al.* The Dishevelled, EGL-10 and pleckstrin (DEP) domain-containing protein DEPDC7 binds to CARMA2 and CARMA3 proteins, and regulates NF- $\kappa$ B activation. *PLoS One* 2014; 9(12): e116062.