DOI:10.13656/j.cnki.gxkx.20180528.005
游金,李游,施洁,等.LC3 真核表达载体构建及其在 293T 细胞中自噬诱导研究[J].广西科学,2018,25(3):313-317,324.
YOU J,LI Y,SHI J,et al.Study on construction of LC3 eukaryotic expression vector and its autophagy induction in 293T cells [J].Guangxi Sciences,2018,25(3):313-317,324.

LC3 真核表达载体构建及其在 293T 细胞中自噬诱导研究*

Study on Construction of LC3 Eukaryotic Expression Vector and Its Autophagy Induction in 293T Cells

游　金,李　游,施　洁,卢　洁,卢春花**
YOU Jin,LI You,SHI Jie,LU Jie,LU Chunhua

(广西大学生命科学与技术学院,广西南宁　530005)
(College of Life Science and Technology,Guangxi University,Nanning,Guangxi,530005,China)

摘要:【目的】构建 pEGFP-N1-LC3 真核表达载体,并将其转染进人胚肾细胞 293T,通过 Earle's 盐平衡液(Balanced salt solution,EBSS)饥饿诱导观察细胞自噬现象。**【方法】**RT-PCR 扩增 LC3 基因,并将其插入 pEGFP-N1 真核表达载体构建重组质粒。将重组质粒转染至人胚肾细胞 293T,显微镜观察、Western blot 检测 GFP-LC3 融合蛋白表达情况。对转染细胞进行 Earle's 盐平衡液饥饿诱导,通过 Western blot 验证自噬指标,激光共聚焦显微镜观察自噬泡形成。**【结果】**成功构建 pEGFP-N1-LC3 真核表达载体,并在 293T 细胞中成功表达目的蛋白,在进行 Earle's 盐平衡液饥饿诱导后观察到自噬泡的形成,Western blot 检测到 LC3-Ⅰ向 LC3-Ⅱ的转化。**【结论】**本实验为研究自噬在癌细胞病理进程中的机制提供了实验素材。

关键词:LC3　细胞自噬　绿色荧光蛋白　人胚肾 293T 细胞
中图分类号:Q291　　**文献标识码:**A　　**文章编号:**1005-9164(2018)03-0313-05

Abstract:【Objective】The pEGFP-N1-LC3 eukaryotic expression vector was constructed and transfected into human embryonic kidney 293T cells and the expression of the fusion protein in the state of autophagy was observed by Earle's Balanced salt solution (EBSS) starvation induction.**【Methods】**The LC3 gene was amplified by RT-PCR and inserted into pEGFP-N1 eukaryotic expression vector to construct a recombinant plasmid. The recombinant plasmids were transfected into 293T cells and the expression of the GFP-LC3 fusion protein was observed under fluorescent microscope and detected by Western blot. The transfected cells were subjected to starvation with Earle's Balanced salt solution, then the autophagic development was confirmed by Western blot and the formation of autophagic vacuoles was observed by confocal laser scanning microscope.**【Results】**The eukaryotic expression vector pEGFP-N1-LC3 was constructed and the recombinant protein was efficiently expressed in 293T cells. Autophagic vacuoles were observed after starvation induced by Earle's Balanced salt

收稿日期:2018-04-12
作者简介:游　金(1992－),男,硕士研究生,主要从事肿瘤相关蛋白质的功能研究。
*国家自然科学基金项目(81360324,81760500),广西自然科学基金项目(2017GXNSFAA198362)和广西高等教育本科教学改革工程项目(2017JGB130)资助。
**通信作者:卢春花(1971－),女,副教授,主要从事肿瘤相关蛋白质的功能研究,E-mail:chlu@gxu.edu.cn。

solution, and then the conversion of LC3-Ⅰ to LC3-Ⅱ was detected by Western blot. **【Conclusion】**This experiment provided an experimental material for the later study on the mechanisms of autophagy in tumorigenesis.

Key words: LC3, autophagy, green fluorescent protein, human embryonic kidney 293T cells

0 引言

【研究意义】自噬是一种蛋白质大量降解过程，该过程中待降解的蛋白质包裹于自噬体中，传递至溶酶体或者液泡中进行降解[1]。自噬对于生命体的生存、分化及维持自身稳态起着至关重要的作用。大量的研究表明，肿瘤与细胞自噬有密切的关系[2]。微管相关蛋白 1 轻链 3（Microtubule-associated protein 1 light chain 3，MAP1-LC3，LC3）是自噬相关基因 Atg8（Autophagy-related 8 genes，Atg8s）的同源物之一[3]。**【前人研究进展】**LC3 具有 LC3-Ⅰ、LC3-Ⅱ两种剪切形式，在自噬过程中，LC3-Ⅰ在泛素样酶的作用下会逐渐转变成 LC3-Ⅱ[4]。LC3-Ⅱ定位于自噬体膜，研究发现 LC3-Ⅱ在自噬泡的形成中起着十分重要的作用[5]，是哺乳动物的自噬体标志物，已经被用于研究神经肌肉疾病、肿瘤发生、细菌病毒感染等[6-7]。**【本研究切入点】**通过构建 pEGFP-N1-LC3 真核表达载体，转染人胚肾细胞 293T 表达带有绿色荧光的 GFP-LC3 融合蛋白，荧光显微镜下观察其定位。然后通过 Earle's 盐平衡液饥饿诱导实验观察自噬的发生过程。**【拟解决的关键问题】**获得能够在真核细胞中表达 GFP-LC3 融合蛋白的真核表达载体，为以后进一步研究自噬在癌细胞病理进程中的机制提供一种新的实验工具。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 质粒、菌株和细胞

pEGFP-N1 真核表达载体、人胚肾细胞 293T、人肺腺癌细胞 A549 均由本实验室保存。

1.1.2 主要试剂

总 RNA 提取试剂盒、质粒小提试剂盒、DNA 纯化回收试剂盒均购自天根公司；PrimeScrip Ⅱ 1st Strand cDNA Synthesis Kit、PrimeSTAR GST DNA Polymerase 高保真酶、T4 DNA Ligase、限制性内切核酸酶 *EcoR* Ⅰ和 *Xho* Ⅰ均购自 Takara 公司；胎牛血清（FBS）、DMEM 细胞培养液、细胞内保护液 DMSO 购自 Gibco 公司；无血清培养基 Opti-MEM、转染试剂 Lipofectamine LTX 购自 Invitrogen 公司；Protein Marker、PVDF 膜购自 BIO-RAD 公司，抗 LC3 抗体购自武汉三鹰公司，内参抗体和辣根过氧化物酶二抗购自 EPITOMICS 公司。

1.2 方法

1.2.1 人肺腺癌 A549 细胞 cDNA 的合成

复苏培养实验室保存的人肺腺癌 A549 细胞，待细胞长满后，使用总 RNA 提取试剂盒提取 A549 细胞总 RNA。之后将获得的总 RNA 使用 PrimeScrip Ⅱ 1st Strand cDNA Synthesis Kit 进行 RT-PCR 合成 A549 细胞的 cDNA。

1.2.2 重组质粒的构建及鉴定

以人肺腺癌细胞 A549 的总 RNA 中反转录获得的 cDNA 为模板，根据人 LC3 蛋白基因编码序列设计引物，上、下游引物分别带有 *Nhe* Ⅰ和 *EcoR* Ⅰ酶切位点序列。上下游引物序列：

LC3（GFP）-F 5′-ACGT GCTAGCATGCCCTCAGACCGGCCTT-3′，

LC3（GFP）-R 5′-ACGT GAATTCGGAAGCCGAAGGTTTCCTG-3′。

使用 PrimeSTAR GST DNA Polymerase 高保真酶进行 PCR 扩增（94℃ 5 min，94℃ 30 s，58℃ 30 s，72℃ 2 min，循环 30 次；72℃ 10 min），扩增得到目的片段的大小约为 470 bp。将扩增片段和 pEGFP-N1 空载体用 *Nhe* Ⅰ、*EcoR* Ⅰ双酶切 3 h，电泳回收酶切片段。用 T4 DNA Ligase 连接载体与目的片段，转化 DH5α 感受态细胞。从转化重组质粒的平板中挑取单菌落在含卡那霉素的液体 LB 培养基中进行培养，提取质粒进行双酶切鉴定。将初步鉴定正确的重组质粒进行序列测定，BLAST 进行序列比对，结果表明测序结果与 NCBI 中公布的 LC3 基因信息完全一致，将构建成功的质粒命名为 pEGFP-N1-LC3。

1.2.3 重组质粒的转染及融合蛋白表达检测

1.2.3.1 荧光显微镜下观察融合蛋白定位

按照每孔 5×10^5 个细胞的接种量，将 293T 细胞接种于 6 孔板中，细胞融合至 80%时，按照 Lipofectamine LTX 说明书转染重组质粒 pEGFP-N1-LC3 以及空载体 pEGFP-N1，分别设为实验组和空载体对照组。转染 24 h 后吸取 DMEM 完全培养基，加入新的培养基并在 Leica DMi8 倒置荧光显微镜下观察融合蛋白的分布情况。

1.2.3.2　融合蛋白表达检测

收集空载体对照组以及实验组细胞，裂解提取总蛋白，定量后进行 SDS-PAGE 电泳，采用电转法[8]将蛋白转至 PVDF 膜，5%脱脂牛奶封闭 2 h，分别孵育 LC3 多克隆抗体（1∶1 000）、GAPDH 多克隆抗体（1∶1 000），4℃孵育过夜，PBST 洗涤 3 次，羊抗兔二抗（1∶2 000）室温孵育 2 h，PBST 洗涤 3 次，ECL 发光液显色，暗盒 X 光胶片显影。

1.2.4　Earle's 盐平衡液饥饿诱导实验检测自噬

1.2.4.1　Western blot 检测细胞自噬

将转染了重组质粒 pEGFP-N1-LC3 的 293T 细胞分为 4 组：①对照组：正常培养 24 h；②实验组 1：正常培养 20 h 后 Earle's 盐平衡液饥饿诱导自噬 4 h；③实验组 2：正常培养 16 h 后 Earle's 盐平衡液饥饿诱导自噬 8 h；④实验组 3：Earle's 盐平衡液饥饿诱导自噬 24 h。分别收集实验组、对照组总蛋白，定量后进行 SDS-PAGE 电泳，湿法转膜电转至 PVDF 膜上，使用 5%脱脂牛奶室温封闭 2 h，依次敷 LC3 多克隆抗体（1∶1 000）、GAPDH 抗体，4℃过夜，PBST 漂洗 3 次，用羊抗兔 IgG（1∶3 000）室温敷 2 h，PBST 漂洗 3 次，ECL 发光液显色显影，将得到的胶片扫描并用软件进行处理。

1.2.4.2　激光共聚焦显微镜下观察自噬现象

分别将转染了重组质粒以及空载体的 293T 细胞以每孔 2×10^5 个细胞接种到有爬片的 24 孔板中，24 h 后分为 2 组；①实验组：Earle's 盐平衡液饥饿诱导 2 h；②对照组：继续正常培养 2 h。两组细胞先去除培养基，PBS 漂洗 3 次，再用 4%多聚甲醛固定 10 min，PBS 清洗 3 次，接着用 0.2% Triton 进行透化，PBS 清洗 3 次，最后用 10%山羊血清封闭 1 h，PBS 清洗 3 次。取出爬片，加入含有 DAPI 的封片剂，封片，然后置于 Leica TCS SP8 共聚焦显微镜下，观察非自噬诱导状态下融合蛋白的分布情况，以及诱导自噬后细胞内自噬体的形成情况。

2　结果与分析

2.1　人肺腺癌 A549 细胞 cDNA 的合成

使用总 RNA 提取试剂盒提取 A549 细胞的总 RNA，琼脂糖凝胶电泳结果显示成功获得了高纯度的总 RNA（图 1）。之后将获得的总 RNA 使用 PrimeScrip Ⅱ 1st Strand cDNA Synthesis Kit 进行RT-PCR，制备 A549 细胞的 cDNA。

2.2　重组质粒的构建及鉴定

以 A549 细胞总 RNA 反转录的 cDNA 为模板，设计分别带有 *Nhe* Ⅰ和 *EcoR* Ⅰ酶切位点序列的上下游引物进行 PCR 扩增，得到片段大小约为 470 bp 的 LC3 全长基因（图 2a）。扩增产物和 pEGFP-N1 空载体同时进行双酶切、回收、连接、转化，得到重组 pEGFP-N1-LC3 质粒。将重组质粒用限制性内切酶 *EcoR* Ⅰ和 *Xho* Ⅰ进行双酶切，电泳结果显示大小约 470 bp 的特异条带（图 2b）。将重组质粒送 Invitrogen 公司测序，测序结果显示与 LC3 序列完全一致，证明本实验成功构建了 pEGFP-N1-LC3 真核表达载体。

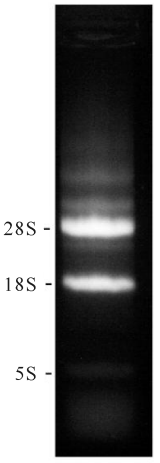
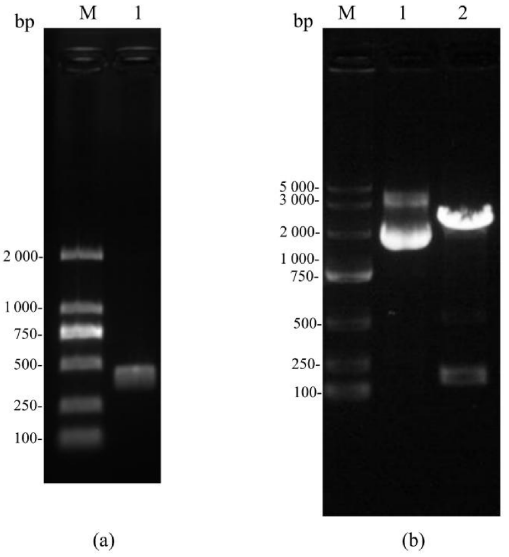


图 1　人肺腺癌 A549 细胞总 RNA 的提取

Fig. 1　Total RNA extraction from human lung adenocarcinoma A549 cells



（a）RT-PCR 扩增 LC3 基因；M：DL2000 marker；1：LC3 基因；（b）重组质粒的双酶切验证；M：DL5000 marker；1：pEGFP-N1-LC3 重组质粒；2：pEGFP-N1-LC3 重组质粒的 *Nhe* Ⅰ和 *EcoR* Ⅰ双酶切

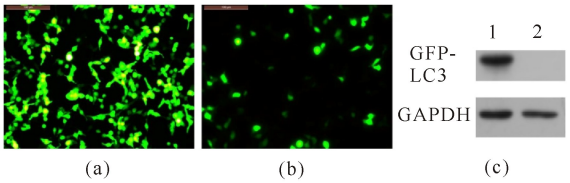
（a）RT-PCR amplification of LC3 gene；M：DL2000 marker；1：LC3 gene；（b）Double digestion of recombinant plasmid；M：DL5000 marker；1：recombinant plasmid pEGFP-N1-LC3；2：Recombinant plasmid pEGFP-N1-LC3 digested with *Nhe* Ⅰ and *EcoR* Ⅰ

图 2　pEGFP-N1-LC3 重组质粒的鉴定

Fig. 2　Identification of pEGFP-N1-LC3 recombinant plasmid

2.3 融合蛋白在 293T 细胞中的表达鉴定

将 pEGFP-N1-LC3 重组质粒转染入 293T 细胞，对照组转染 pEGFP-N1 空载体，24 h 后在荧光倒置显微镜下观察，转染重组质粒以及空载体细胞都表达绿色荧光蛋白，且荧光均匀分布于细胞质中。但是，转染重组载体的细胞荧光较弱，可能是因为重组质粒分子量较大，转染效率相对比空载体低而导致的（图 3a～b）。收集实验组和对照组转染细胞，裂解提取总蛋白进行 Western blot 实验，结果显示融合蛋白在 293T 细胞中成功表达（图 3c）。



（a）空载体转染 293T 细胞；（b）pEGFP-N1-LC3 重组质粒转染 293T 细胞；（c）Western blot 检测 GFP-LC3 融合蛋白表达；GAPDH：甘油醛-3-磷酸脱氢酶（Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase），作为内参；1：转染 pEGFP-N1-LC3 重组质粒；2：转染 pEGFP-N1 空载体

（a）Empty vector transfected 293T cells；（b）pEGFP-N1-LC3 recombinant plasmid transfected 293T cells；（c）Western blot detection of GFP-LC3 fusion protein expression. GAPDH（Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase）were used as internal reference；1：Cells transfected with pEGFP-N1-LC3 recombinant plasmid；2：Cells transfected with pEGFP-N1 vector

图 3　GFP-LC3 融合蛋白在 293T 细胞中的表达的检测

Fig. 3　Detection of GFP-LC3 fusion protein expression in 293T cells

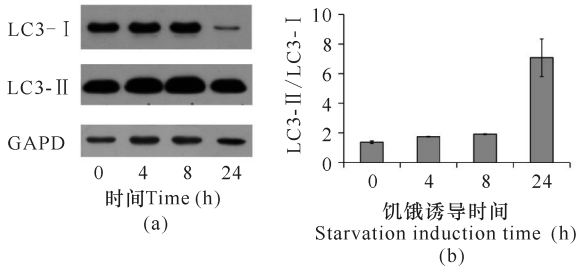
2.4 Earle's 盐平衡液饥饿诱导自噬小体的形成

2.4.1 Western blot 检测饥饿诱导情况

收集实验组 1、实验组 2、实验组 3 及对照组细胞，裂解提取总蛋白进行 Western blot 实验，实验结果及其灰度分析显示，随着饥饿诱导的进行，LC3-Ⅰ向 LC3-Ⅱ的转化率逐渐增加，自噬现象逐渐增强（图 4）。实验结果表明 Earle's 盐平衡液能够成功诱导自噬现象。该方法可以用于进一步研究细胞自噬的亚结构变化。

2.4.2 激光共聚焦显微观察自噬体形成

将转染重组质粒的细胞分为实验组和对照组：实验组诱导自噬 2 h，对照组正常培养 2 h。制作爬片并于激光共聚焦显微镜下观察：对照组中绿色荧光蛋白均匀分布于细胞质中，并没有形成点状自噬泡，说明此时并未发生细胞自噬（图 5a）；而在实验组中，293T 细胞的细胞质中出现了点状自噬泡，表明此时出现了细胞自噬（图 5b）。

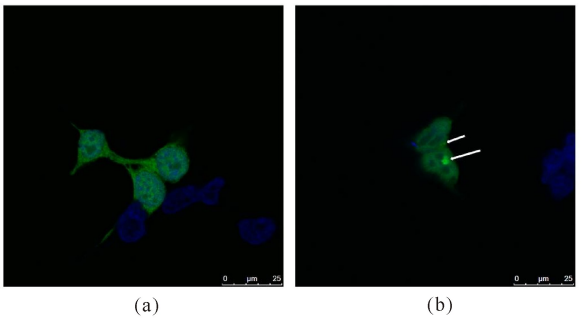


（a）Western blot 检测结果；GAPDH 为内参；（b）LC3-Ⅱ/LC3-Ⅰ蛋白量比值灰度分析

（a）Western blot results. GAPDH were used as internal reference；（b）Gray scale analysis of LC3-Ⅱ/LC3-Ⅰ protein ratio

图 4　Western blot 检测饥饿诱导后 LC3-Ⅰ向 LC3-Ⅱ的转化

Fig. 4　Western blot detected the conversion from LC3-Ⅰ to LC3-Ⅱ after starvation induction



（a）正常培养的 293T 细胞；（b）Earle's 盐平衡液饥饿诱导自噬 2 h 的 293T 细胞。蓝色荧光为 DAPI 染色的细胞核，而绿色荧光为 GFP-LC3 融合蛋白

（a）Normally cultured 293T cells；（b）293T cells induced by Earle's Balanced salt solution for 2 h. Nucleus stained with DAPI showed blue and GFP-LC3 fusion protein was green

图 5　激光共聚焦下观察饥饿诱导后的自噬泡形成（箭头指示自噬泡）

Fig. 5　Observation of autophagic vacuolization induced by starvation under confocal laser scanning microscope（Arrows indicate the autophagic bubble）

3 讨论

自噬是细胞内一种分解代谢途径。该过程是通过形成自噬体、双膜囊泡，将受损或者过量的蛋白质及细胞器递送到溶酶体中，实现这些成分的再循环，从而维持体内平衡，增强了生存能力[9]。而在肿瘤细胞中，自噬起着一个动态的角色：一方面，在肿瘤发生早期，自噬可以通过消除多余的蛋白、受损的细胞器等从而抑制癌细胞的生长；另一方面，一旦肿瘤形成以后，自噬的促活功能有助于癌细胞在饥饿环境中生

存，抵抗电离辐射以及化学疗法，促进了癌细胞的生存。可以说，自噬既能够抑制肿瘤生长也能够促进肿瘤的生长，这种矛盾的作用引发了人们对于自噬与癌症关系的激烈争论[10-11]。

自噬相关基因是细胞生存必不可少的重要基因，目前在哺乳动物中发现了 4 个自噬相关基因 Atg8 同源物：LC3、GABARAP、GATE-16、Atg8L[12]。而在其中，LC3 是研究得最为透彻的一个。LC3 蛋白有 LC3-Ⅰ和 LC3-Ⅱ两种剪切形式。在自噬体膜形成过程中，LC3 前体在 Atg4B 作用下形成 LC3-Ⅰ，游离 LC3-Ⅰ进一步在 Atg7 和 Atg3 活性位点的介导下与磷脂结合形成膜结合形式的 LC3-Ⅱ，定位于自噬膜。随着自噬进行，LC3-Ⅱ和 LC3-Ⅰ的比值会逐渐增加[13]。该过程对于自噬体的形成具有关键的调控作用，所以 LC3-Ⅱ与 LC3-Ⅰ相对比值是检测自噬启动的关键性指标。

绿色荧光蛋白(Green fluorescent protein，GFP)是一种在紫外或蓝光激发下能够发出绿色荧光的蛋白[14]。绿色荧光蛋白具有性质稳定、灵敏度高、持续时间长、对目的基因结构功能没有影响等优点，具有十分广泛的应用前景，现在已应用于分子标记、药物筛选、抗体制备等[15]。所以可以用绿色荧光标记的 LC3 蛋白对自噬泡形成情况进行定量定位检测。

Earle's 平衡盐溶液是一种磷酸盐缓冲液，该缓冲液内不包含氨基酸以及血清，能够满足细胞内一定代谢的需要，除了能够诱导自噬以外并无其他细胞毒性，是一种常用的饥饿诱导自噬试剂[16-17]。

本研究将目的基因 LC3 插入 pEGFP-N1 真核表达载体，使其能够在真核细胞内表达 GFP-LC3 绿色荧光融合蛋白，将重组质粒转染进人胚肾细胞 293T，通过 Earle's 盐平衡液饥饿诱导实验诱导细胞自噬，并在荧光显微镜下观察融合蛋白的表达情况。显微观察可以发现，pEGFP-N1-LC3 真核表达载体在 293T 细胞能够大量表达 GFP-LC3 融合蛋白，未饥饿诱导时，荧光融合蛋白均匀分布于细胞质，并没有自噬泡的形成；而进行 Earle's 盐平衡液饥饿诱导后，可以观察到细胞内产生了颗粒状的自噬泡，表明产生细胞自噬。Western blot 测定结果表明，转染重组表达质粒的 293T 细胞能够大量表达 GFP-LC3 融合蛋白，且随着饥饿诱导时间的推进，LC3-Ⅰ向 LC3-Ⅱ的转化更加明显，细胞自噬逐渐增强，Earle's 盐平衡液饥饿诱导作用明显。

4 结论

本研究成功构建了 pEGFP-N1-LC3 真核表达载体，其能够在转染的 293T 细胞中大量表达 GFP-LC3 融合蛋白，且通过 Earle's 盐平衡液饥饿诱导能够明显观察到自噬现象，为以后进一步研究自噬在癌细胞病理进程中的机制提供实验材料。

参考文献：

[1] KLIONSKY D J，EMR S D. Autophagy as a regulated pathway of cellular degradation[J]. Science，2000，290：1717-1721.

[2] MATHEW R，KARANTZA-WADSWORTH V，WHITE E. Role of autophagy in cancer[J]. Nature Reviews Cancer，2007，7(12)：961-967.

[3] KABEYA Y，MIZUSHIMA N，UENO T，et al. LC3，a mammalian homologue of yeast Apg8p，is localized in autophagosome membranes after processing[J]. The EMBO Journal，2000，19(21)：5720-5728/2000.

[4] 倪志华，张玉明，邓传怀，等. LC3 基因在细胞自噬过程中的表达研究[J]. 湖北农业科学，2015，54(20)：4932-4936.
NI Z H，ZHANG Y M，DENG C H，et al. Expression of LC3 gene in cell autophagy[J]. Hubei Agricultural Sciences，2015，54(20)：1932-4936.

[5] SOU Y S，WAGURI S，IWATA J，et al. The Atg8 conjugation system is indispensable for proper development of autophagic isolation membranes in mice[J]. Molecular Biology of the Cell，2008，19：4762-4775.

[6] TANIDA I，UENO T，KOMINAMI E. LC3 conjugation system in mammalian autophagy[J]. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology，2004，36(12)：2503-2518.

[7] KIMURA S，FUJITA N，NODA T，et al. Chapter 1 monitoring autophagy in mammalian cultured cells through the dynamics of LC3[J]. Methods in Enzymology，2009，452：1-12.

[8] 朴君，武翼，朴敬爱，等. 血管内皮细胞黏附分子胞外区基因真核表达载体构建及表达[J]. 免疫学杂志，2013，29(2)：156-160.
PIAO J，WU Y，PIAO J A，et al. Construction and expression of the eukaryotic expression vector of VCAM-1extracellular domains [J]. Immunological Journal，2013，29(2)：156-160.

[9] CECCONI F，LEVINE B. The role of autophagy in mammalian development：cell makeover rather than cell death[J]. Developmental Cell，2008，15(3)：344-357.

[10] LEVINE B. Cell biology：Autophagy and cancer[J]. Nature，2007，446(7137)：745-747.

[11] KIMMELMAN A C. The dynamic nature of autophagy in cancer[J]. Genes Dev，2011，25(19)：1999-2010.

(下转第 324 页 Continue on page 324)

nity,2010,11(7):561-572.

[8] MIKOCKA-WALUS A A,TURNBULL D A,MOULDING N T, et al. Controversies surrounding the comorbidity of depression and anxiety in inflammatory bowel disease patients: a literature review[J]. Inflammatory Bowel Diseases,2007,13(2):225-34.

[9] VICTOR F C,GOTTLIEB A B. TNF-alpha and apoptosis:Implications for the pathogenesis and treatment of psoriasis[J]. J Drugs Dermatol,2002,1(3):264-275.

[10] O'NEILL L ABOWIE A G. The family of five:TIR-domain-containing adaptors in Toll-like receptor signalling[J]. Nat Rev Immunol,2007,7(5):353-64.

[11] SEDLAK T W,OLTVAI Z N,YANG E, et al. Multiple Bcl-2 family members demonstrate selective dimerizations with Bax[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1995,92(17):7834-7838.

[12] SWEET L,SCHOREY J S. Glycopeptidolipids from Mycobacterium avium promote macrophage activation in a TLR2- and MyD88-dependent manner[J]. J Leukoc Biol,2006,80(2):415-423.

(责任编辑:陆　雁　符支宏)

(上接第 317 页 Continue from page 317)

[12] TANIDA I,SOU Y S,MINEMATSU-IKEGUCHI N, et al. Atg8L/Apg8L is the fourth mammalian modifier of mammalian Atg8 conjugation mediated by human Atg4B,Atg7 and Atg3[J]. Febs Journal, 2006, 273(11):2553-2562.

[13] TANIDA I. Autophagy basics. [J]. Microbiology and Immunology,2011,55:1-11.

[14] 宗兆文,程天民.绿色荧光蛋白标记在干细胞移植中的应用[J].中国临床康复,2006,10(29):141-143.
ZONG Z W,CHENG T M. Application of green fluorescent protein labeling in the study of stem cells transplantation[J]. Chinese Journal of Clinical Rehabilitation,2006,10(29):141-143.

[15] 孙艺佩.绿色荧光蛋白——结构及应用[J].当代化工研究,2017(8):124-125.
SUN Y P. Green fluorescent protein——structure and application[J]. Chemical Intermediate, 2017(8): 124-125.

[16] 张文亮,张明明,刘斌,等. Earle's 盐平衡液饥饿诱导 DLD-1, HCT-116, A2780, CHO, Hep G2 和 SMMC7721 肿瘤细胞系自噬发生的时间优化[J].中山大学学报:自然科学版,2016,55(4):108-117.
ZHANG W L,ZHANG M M,LIU B, et al. Optimal timing of autophagy occurrence induced by earle's balanced salts solution in DLD-1,HCT-116,A2780,CHO, Hep G2 andSMMC7721 cancer cell lines[J]. Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Sunyatseni,2016,55(4):108-117.

[17] MIN Y,XU W,LIU D,et al. Earle's balanced salts solution and rapamycin differentially regulate the Bacillus Calmette-Guerin-induced maturation of human dendritic cells[J]. Acta Biochimica et Biophysica Sinica,2013,45(3):162-169.

(责任编辑:陆　雁)