·基础研究·

14-3-3η蛋白的生物信息学分析及原核表达

安冬洁,魏调霞,高春辰,曹秀丽,赵俊龙,秦鸿雁*
(空军军医大学基础医学部遗传学与发育生物学教研室,西安 710032)

【摘 要】 **目的** 分析巨噬细胞不同极化状态下14-3-3η mRNA表达及其生物信息,并构建14-3-3η蛋白原核表达载体,为研究其在巨噬细胞活化中的作用提供实验基础。**方法** 提取C57BL/6小鼠骨髓原代巨噬细胞mRNA,反转录后用实时定量聚合酶链式反应(PCR)检测14-3-3η mRNA水平的改变。运用ProtParam tool、SOPMA等在线软件对14-3-3η氨基酸序列进行分析。以小鼠巨噬细胞cDNA为模板,采用PCR的方法扩增14-3-3η基因,插入pGEX-4T-3载体中,双酶切和测序鉴定正确的重组质粒转化入大肠杆菌BL21菌株,用异丙基硫代半乳糖苷诱导其原核表达并纯化,SDS-PAGE法和Western blotting法对融合蛋白进行鉴定。采用Graphpad prism 5软件进行统计分析。样本比较均采用配对*t*检验。**结果** M1型巨噬细胞14-3-3η表达降低,M2型趋势相反。生物信息学表明14-3-3η蛋白其二级结构中主要为α-螺旋(占62.60%)且疏水性较差(疏水系数为-0.607)。酶切和测序结果提示重组质粒pGEX-4T-3-14-3-3η构建成功。SDS-PAGE和Western blotting结果表明融合蛋白谷胱甘肽-S-转移酶(GST)-14-3-3η成功表达和纯化。**结论** 本实验对14-3-3η进行了初步的生物信息学分析,成功表达并纯化融合蛋白GST-14-3-3η,为14-3-3η在巨噬细胞极化上的功能研究奠定了实验基础。

【关键词】 计算生物学;巨噬细胞;原核表达;蛋白纯化;14-3-3η
【中图分类号】 R392.12 【文献标志码】 A 【DOI】 10.11915/j.issn.1671-5403.2018.03.047

Bioinformatics analysis and prokaryotic expression of 14-3-3η protein

AN Dong-Jie, WEI Tiao-Xia, GAO Chun-Chen, CAO Xiu-Li, ZHAO Jun-Long, QIN Hong-Yan*
(Department of Medical Genetics and Developmental Biology, School of Basic Medicine, Air Force Medical University, Xi'an 710032, China)

【**Abstract**】 **Objective** To detect the expression profiles of 14-3-3η mRNA in different polarized macrophages, analyze the bioinformation, and construct the prokaryotic expression vector of 14-3-3η in order to provide an experimental basis for further study on macrophage polarization. **Methods** After the mRNA of bone marrow derived macrophages from C57BL/6 mice was extracted, real-time quantitative polymerase chain reaction (qRT-PCR) was used to detect the mRNA expression of 14-3-3η after reverse transcription. ProtParam tool, SOPMA and other online statistics were used to analyze the amino acid sequence of 14-3-3η. With mouse macrophage cDNA as template, PCR was employed to amplify the target genes, and the products were inserted into pGEX-4T-3 vector. After verification by double-enzymes digestion and sequencing, the correct recombinant plasmids were transformed into the *Escherichia coli* strain BL21. Then the bacteria were induced by isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG), and the expressed proteins were purified and identified by SDS-PAGE and Western blotting. Graphpad prism 5 was used to perform the statistical analysis. Paired *t* test was employed for the comparison among different samples. **Results** The mRNA expression level of 14-3-3η was decreased in M1 macrophages, but it was increased in M2 macrophages. Bioinformatic analyses showed that α-helix (62.60%) was the main component of its secondary structure, and it had poor hydrophobicity (hydrophobic coefficient = -0.607). Enzymes digestion and sequencing indicated that the vector pGEX-4T-3-14-3-3η was successfully constructed. GST-14-3-3η protein was induced and identified by SDS-PAGE and Western blotting. **Conclusion** Primary bioinformatic analyses, successful expression and purification of fusion protein GST-14-3-3η are achieved in this study, which founds the experimental basis for 14-3-3η function in macrophage polarization.

【**Key words**】 computational biology; macrophages; prokaryotic expression; protein purification; 14-3-3η
This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (81530018, 31570878, 31371474).
Corresponding author: *QIN Hong-Yan*, *E-mail*: *hongyanqinfm@gmail.com*

收稿日期:2017-10-25;**修回日期**:2017-11-20
基金项目:国家自然科学基金(81530018;31570878;31371474)
通信作者:秦鸿雁,E-mail:hongyanqinfm@gmail.com

14-3-3蛋白是一类广泛表达的酸性调控蛋白家族,其在哺乳动物中存在7种亚型(β,ε,η,γ,τ,ζ和σ)[1],且不同亚型间氨基酸顺序具有高度的一致性和保守性[2]。14-3-3蛋白通常以同源或异源二聚体和靶蛋白通过特定的磷酸化基序相互作用[3],通过改变靶蛋白细胞亚定位、磷酸化状态和活化状态来参与许多重要的生命过程[2],包括转录翻译、细胞内信号转导、蛋白运输、细胞周期和细胞凋亡等[4,5]。

单核巨噬细胞分布在体内各组织器官当中,在天然免疫、系统代谢、血管生成、恶性肿瘤中具有重要的调控作用[6]。不同的微环境信号刺激下,巨噬细胞可以发生表型和功能的改变,分为经典活化的M1型巨噬细胞和替代活化的M2型巨噬细胞。M1型巨噬细胞高表达肿瘤坏死因子-α(tumor necrosis factor-α,TNF-α)、白细胞介素-6(interleukin-6,IL-6)、IL-1等促炎因子,具有抗菌抗肿瘤的作用;M2型巨噬细胞则高表达精氨酸酶1(arginase 1)、类几丁质酶3样分子3(chitinase 3-like 3,Ym1)、IL-10、甘露糖受体(Mrcl)等,具有抗炎促肿瘤和促进组织修复的功能[7]。研究表明,14-3-3对巨噬细胞功能的活化和生存起着重要的作用,已报道的亚型主要有14-3-3ζ、14-3-3β和14-3-3ε。在炎性细胞因子干扰素-γ(interferon-γ,INF-γ)的刺激下,14-3-3ζ通过调节coronin 1蛋白亚细胞定位来调控巨噬细胞吞噬功能[8]。上皮性卵巢癌及阿尔茨海默病(Alzheimer disease,AD)中相关巨噬细胞14-3-3ζ和14-3-3ε表达异常升高[9,10],提示14-3-3可能通过改变巨噬细胞的功能参与调控疾病的发生发展。研究发现[11],14-3-3η亚型在脂肪组织巨噬细胞M2型极化中扮演重要角色,但是其具体分子机制尚不明确。

本研究在探究不同极化类型巨噬细胞中14-3-3η mRNA表达水平差异的基础上,对其进行生物信息学分析,构建小鼠14-3-3η基因的原核表达载体后诱导表达,得到含有谷胱甘肽-S-转移酶(glutathione S-transferase,GST)标签的14-3-3η蛋白,为今后研究14-3-3蛋白对巨噬细胞功能的作用奠定实验基础。

1 材料与方法

1.1 材料

原核表达载体pGEX-4T-3、大肠杆菌DH5α和BL21菌株(空军军医大学基础医学部遗传学与发育生物学教研室);胰化蛋白胨、酵母提取物和琼脂粉(Oxoid公司);14-3-3抗体(Santa Cruz公司);辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase,HRP)标记羊抗兔IgG(博士德公司);rTaq酶、限制性内切酶、连接酶、DNA marker、蛋白预染maker、质粒提取试剂盒、胶回收试剂盒(TaKaRa公司);HiScript Ⅱ Q RT Super Mix for qRT-PCR和ChamQ™ SYBR® qPCR Master Mix(Vazyme公司);GST标签蛋白纯化试剂盒(碧云天生物技术公司);异丙基硫代半乳糖苷(isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside,IPTG;科昊生物)。

1.2 方法

1.2.1 RNA提取 野生型C57BL/6小鼠骨髓原代巨噬细胞中加入TRIzol,静置5 min后加入氯仿震荡离心,上清加入异丙醇沉淀RNA,用75%乙醇洗2遍RNA,干燥后加入RNase free ddH_2O溶解,定量。

1.2.2 qRT-PCR 每个样品取1000 ng RNA反转录,总体系20 μl,4 μl反转录Mix,剩余体积用RNaes free ddH_2O补平。反应条件为37℃ 30 min,85℃ 15 s。以其作模板进行qRT-RCR(ABI 7500),反应条件:95℃ 30 s,96℃ 5 s,60℃ 34 s,β-actin作为内参基因,其中14-3-3η上游引物序列为5'-ACCATGGCAGATGGGAATGAG-3',下游引物序列为5'-GGTAGCGGTAGTAATCGCCC-3';β-actin上游引物序列为5'-CATCCGTAAAGACCTCTATGCCAAC-3',下游引物序列为5'-ATGGAGCCACCGATCCACA-3'。

1.2.3 pGEX-4T-3-14-3-3η的构建 根据小鼠14-3-3η基因编码区序列设计扩增引物,上下游引物分别加入*Eco*RⅠ和*Sal*Ⅰ酶切位点,上游引物:5'-CGGAATTCAATGGGGGATCGAGAGCAGCT-3',下游引物:5'-GCGTCGACTCAGTTGCCTTCTCCTGCTTCTT-3';以小鼠原代巨噬细胞cDNA为模板进行扩增,PCR反应条件:95℃ 5 min,95℃ 30 s,55℃ 30 s,72℃ 1 min,共35个循环;72℃延伸10 min。扩增好的14-3-3η基因进行琼脂糖凝胶电泳,胶回收PCR产物后用*Eco*RⅠ和*Sal*Ⅰ双酶切,连接pGEX-4T-3载体。连接产物转化感受态DH5α,37℃培养过夜挑取单克隆,37℃摇菌16 h,提取质粒,进行酶切鉴定和测序。

1.2.4 原核表达载体pGEX-4T-3-14-3-3η的小量诱导表达 测序正确的质粒转化入大肠杆菌BL21中,挑取单克隆37℃摇菌过夜,次日以1∶100的比例转接到4 ml LB培养基中,37℃振荡培养到菌液$A_{600\ nm}$达到0.6~1.0时加入IPTG诱导表达,37℃ 5 h。收集菌液,经SDS-PAGE考马斯亮蓝染色法检测。

1.2.5 GST-14-3-3η 蛋白的纯化 按照 1∶100 的比例接种菌液到 100 ml 培养液中,37℃常规培养至菌液 $A_{600\ nm}$ 值达到 0.6 ~ 1.0,加入 IPTG 至终浓度为 0.2 mmol/L,37℃诱导表达 5 h。收集菌液至离心管中,离心收集沉淀。加入裂解缓冲液重悬菌体,冰上超声裂解,收集上清,加入 GST-tag Purification Resin,4℃孵育 60 min,将混合物装入亲和层析空柱管中,洗柱 5 次后洗脱目的蛋白,二辛可宁酸(bicinchoninic acid,BCA)法对纯化蛋白进行定量后,用 SDS-PAGE 考马斯亮蓝染色进行鉴定。

1.2.6 融合蛋白 Western blotting 分析 取 15 μg 融合蛋白行 SDS-PAGE 凝胶电泳,恒流 170 mA 转聚偏二氟乙烯膜(polyvinylidene fluoride,PVDF)2 h,脱脂牛奶封闭 2 h,一抗为兔源 14-3-3 抗体,4℃孵育过夜,二抗为 HRP 标记的羊抗兔抗体,37℃孵育 1 h 后,使用 3,3 - 二氨基联苯胺(diaminobenzidine,DAB)发光显色,观察目的条带。

1.2.7 14-3-3η 蛋白的生物信息学分析 蛋白理化性质预测:ProtParam tool(http://web.expasy.org/protparam/);二级结构预测:SOPMA (http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_sopma.html);疏水性分析由 ProtScale(http://web.expasy.org/protscale/)软件完成。

1.3 统计学处理

采用 Graphpad prism 5 软件进行统计分析。计量资料以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,样本比较均采用配对 t 检验。$P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结 果

2.1 qRT-PCR 检测 14-3-3η 在原代巨噬细胞不同极化状态下 mRNA 表达水平

培养野生型 C57BL/6 小鼠骨髓原代巨噬细胞,脂多糖(lipopolysaccharides,LPS)和 INF-γ 诱导 M1 型极化,IL-4 诱导 M2 型极化。提取 RNA,反转录后用 qRT-PCR 检测 14-3-3η 表达水平。结果表明:14-3-3η在 M1 型巨噬细胞中表达量降低,在 M2 型巨噬细胞中表达量升高,差异具有统计学意义($P < 0.05$;图 1),提示 14-3-3η 可能对巨噬细胞极化起作用。

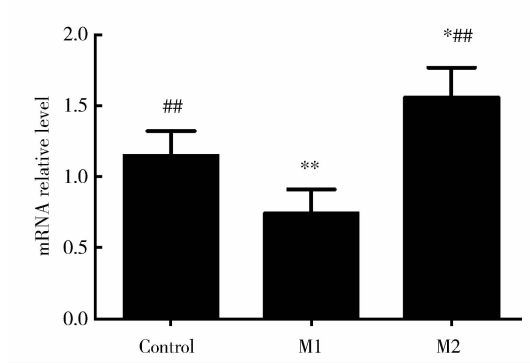


图 1 14-3-3η mRNA 的表达

Figure 1 Expression level of 14-3-3η mRNA ($n = 4$)

Compared with control, $^{*}P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$; compared with M1, $^{\#\#}P < 0.01$

2.2 14-3-3η 蛋白二级结构预测

采用 SOPMA 对 14-3-3η 蛋白的二级结构进行预测,结果以 α - 螺旋和无规则卷曲为主,α - 螺旋占 62.60%,无规则卷曲占 29.27%,另外有 11.38% 的延伸链和 5.69% 的 β 转角,其中 α - 螺旋对蛋白质骨架具有稳定作用,无规则卷曲决定了蛋白质的功能,表明 14-3-3η 蛋白结构具有较高的稳定性(图 2)。

2.3 14-3-3η 蛋白理化性质分析

使用 ProtParam tool 分析 14-3-3η 蛋白序列,分子量为 28.2 ku,理论等电点为 4.81,其中酸性氨基酸总数(天冬氨酸 + 谷氨酸)为 45 个,碱性氨基酸总数(精氨酸 + 赖氨酸)为 32 个。用 ProtScale 程序对 14-3-3η蛋白进行疏水性分析,纵坐标0之上为

```
        10        20        30        40        50        60        70
        |         |         |         |         |         |         |
MGDREQLLQRARLAEQAERYDDMASAMKAVTELNEPLSNEDRNLLSVAYKNVVGARRSSWRVISSIEQKT
hcchhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhcccccttthhhhhhhhhhhhhcccccheeeehhhhhh
MADGNEKKLEKVKAYREKIEKELETVCNDVLALLDKFLIKNCNDFQYESKVFYLKMKGDYYRYLAEVASG
hcttchhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhtttcccccceeeeeecccchhhhhhhhhtt
EKKNSVVEASEAAYKEAFEISKEHMQPTHPIRLGLALNFSVFYYEIQNAPEQACLLAKQAFDDAIAELDT
ccchhhhhhhhhhhhhhhhhhccccccceeeeeecceeeeeccccchhhhhhhhhhhhhhhhhhhh
LNEDSYKDSTLIMQLLRDNLTLWTSDQQDEEAGEGN
hhhtcccchhhhhhhhhhtteeeeeccccchhhhhtc
```

图 2 14-3-3η 蛋白二级结构预测

Figure 2 Prediction of 14-3-3η secondary structure

h: α-helix; e: extended strand; t: β-turn; c: random coil

疏水区,0之下为亲水区,可知14-3-3η第100位氨基酸的疏水系数最高(1.900);第237位氨基酸的疏水系数最低(-2.600)。疏水性氨基酸在肽链中均匀分布,14-3-3η蛋白的疏水系数为-0.607,疏水性较差。一般疏水性较强的分子原核表达时易形成包涵体,此时需采用促进目的蛋白可溶性表达菌株,而14-3-3η疏水性较差,因此我们采用GST可溶标签载体构建14-3-3η原核表达载体,并选用大肠杆菌BL21菌株进行原核表达。

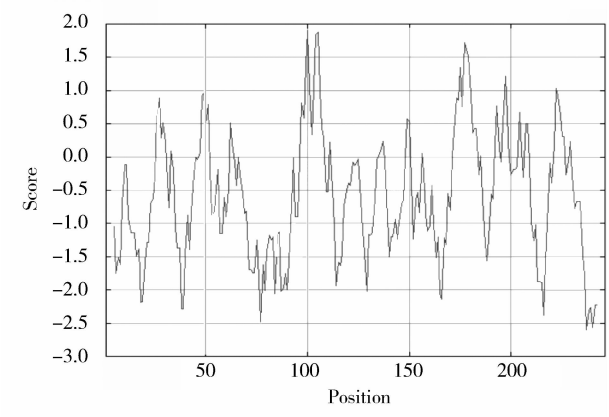


图3 14-3-3蛋白的疏水性分析

Figure 3 Hydrophobicity analysis of 14-3-3η protein

2.4 14-3-3η基因的扩增

以小鼠骨髓来源巨噬细胞cDNA为模板扩增目的序列,特异性扩增出14-3-3η(744 bp),与预期片段大小一致(图4)。

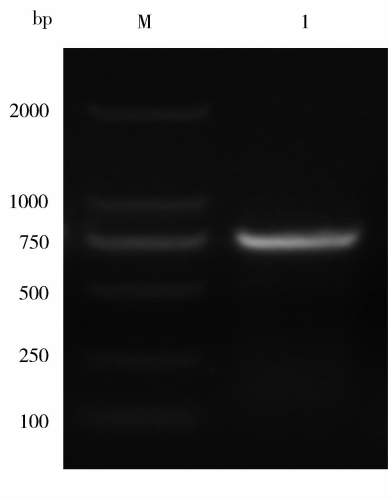


图4 目的基因14-3-3η的PCR扩增

Figure 4 Amplification of 14-3-3η gene by PCR

M: DL2000 DNA marker; 1: 14-3-3η gene fragment; PCR: polymerase chain reaction

2.5 重组质粒pGEX-4T-3-14-3-3η的构建及鉴定

将扩增出的目的片段与pGEX-4T-3空载体经*Eco*RⅠ和*Sal* Ⅰ双酶切后连接,转化入大肠杆菌后挑取单克隆摇菌,提取质粒。pGEX-4T-3-14-3-3η质粒经*Eco*RⅠ和*Sal* Ⅰ双酶切后,可见744 bp条带,符合目的片段大小(图5)。测序结果经比对后同14-3-3η序列一致,提示重组质粒构建成功(图6)。

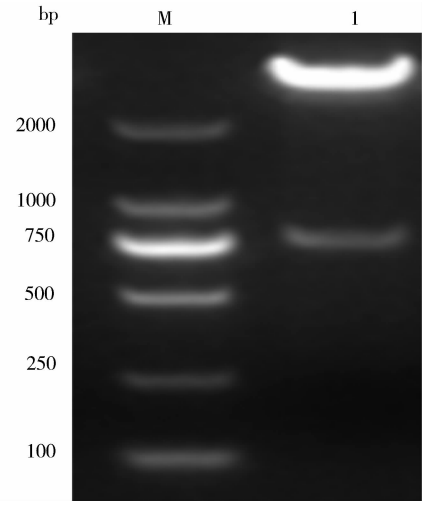


图5 重组载体pGEX-4T-3-14-3-3η双酶切鉴定结果

Figure 5 Identification of pGEX-4T-3-14-3-3η by double-enzyme digestion

M: DL2000 DNA marker; 1: pGEX-4T-3-14-3-3η

2.6 重组表达质粒pGEX-4T-3-14-3-3η的诱导表达

将pGEX-4T-3-14-3-3η重组质粒转化入大肠杆菌BL21菌株中,37℃过夜培养后挑取单克隆活化菌液。首先摸索诱导表达时最佳IPTG浓度,当菌液$A_{600\ nm}$值达到0.6时加入不同终浓度IPTG诱导融合蛋白GST-14-3-3η的表达,融合蛋白预期大小约55 ku。选取最佳IPTG浓度,再用不同温度和不同时间诱导融合蛋白GST-14-3-3η的表达,使融合蛋白尽量表达在细菌裂解液上清液里,收集菌液,裂解后经SDS-PAGE考马斯亮蓝染色法检测,结果表明可溶性融合蛋白最佳表达条件为IPTG浓度0.1 mmol/L,25℃诱导表达16 h(图7)。

2.7 可溶性融合蛋白GST-14-3-3η的纯化

IPTG诱导表达后的菌液经超声裂解,离心后收集上清,按照GST标签蛋白纯化试剂盒操作步骤对融合蛋白GST-14-3-3η进行纯化。纯化蛋白用BCA法进行蛋白定量,蛋白浓度为6 mg/ml,行SDS-PAGE电泳,考马斯亮蓝染色和Western blotting(使用14-3-3抗体)鉴定结果显示GST-14-3-3η融合蛋白得到了较高效的纯化(图8)。

3 讨 论

组织定居巨噬细胞在组织稳态维持、疾病损伤修复方面起着关键的作用[12,13]。在不同的细胞因

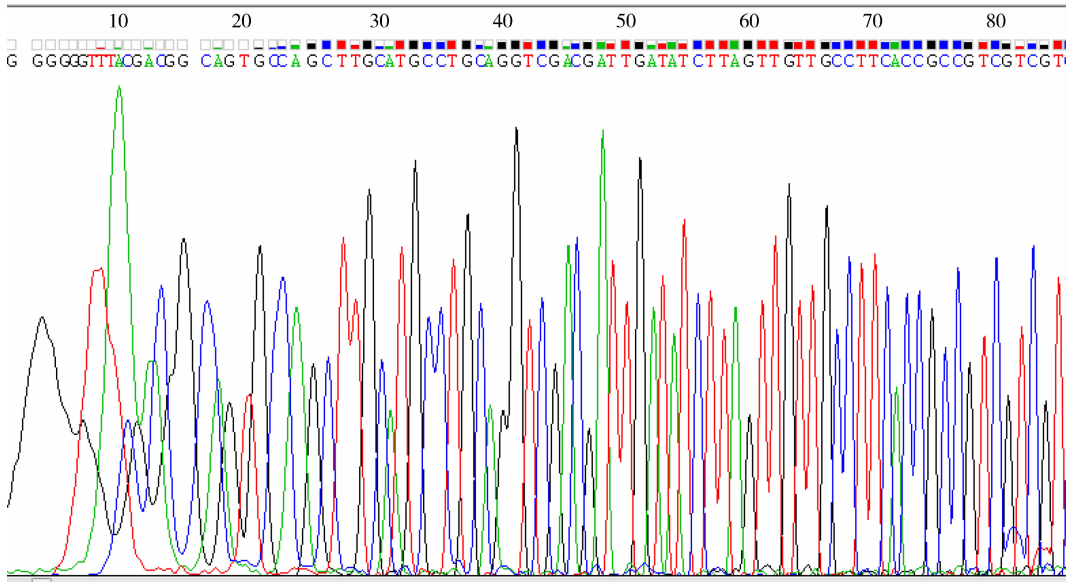


图 6 pGEX-4T-3-14-3-3η 部分测序结果

Figure 6 Partial result of sequencing of pGEX-4T-3-14-3-3η

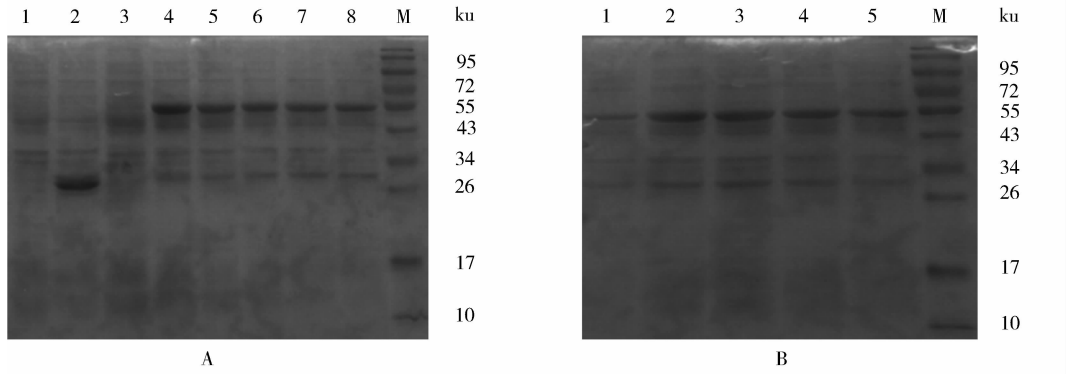


图 7 GST 和 GST-14-3-3η 融合蛋白在大肠杆菌中的诱导表达

Figure 7 Induced expression of GST and GST-14-3-3η protein in *E. coli*

A: lysis of whole bacteria solution (1: empty vector; 2: empty vector induced by 0.5 mmol/L IPTG; 3: GST-14-3-3η; 4 – 8: GST-14-3-3η induced by 0.1, 0.2, 0.5, 0.8, 1.0 mmol/L IPTG respectively); B: supernatant of bacteria lysis (1 – 5: expression induction under the condition of 16℃ 16 h, 20℃ 16 h, 25℃ 16 h, 30℃ 16 h, 37℃ 5 h respectively). M: protein marker; GST: glutathione S-transferase; IPTG: isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside

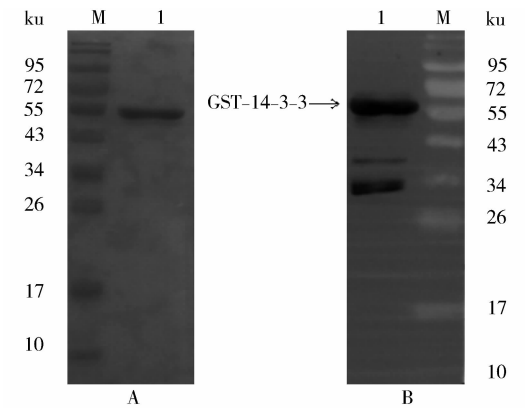


图 8 GST-14-3-3η 蛋白的纯化

Figure 8 Purification of GST-14-3-3η protein

A: identification result of SDS-PAGE coomassie brilliant blue staining (1: purified GST-14-3-3η); B: identification result of Western blotting (1: purified GST-14-3-3η detected by anti-pan-14-3-3 antibody). M: protein marker; GST: glutathione S-transferase

子刺激下,巨噬细胞可以发生表型和功能的转变,其中 M1 型巨噬细胞由 Toll 样受体(Toll-like receptor, TLR)配体蛋白、INF-γ 活化,M2 型巨噬细胞由 IL-4、IL-13、转化生长因子 – β(transforming growth factor-β, TGF-β)等诱导活化,分别调控 TH1 和 TH2 型免疫应答[7]。巨噬细胞的极化则依赖于体内多种信号通路及信号分子在转录水平或翻译后水平的调控[14]。

14-3-3 蛋白在细胞内可以和蛋白激酶 B、叉头族转录因子 O 等超过 200 种分子相互作用[15],主要依赖靶蛋白上 2 种特定的 14-3-3 结合基序:RSXpS/TXP 和 RXXXpSXP(pS 为磷酸化的丝氨酸,X 为任意氨基酸)[1]。由于 14-3-3 靶蛋白的多样性,14-3-3 蛋白在细胞周期、细胞分化、生存、凋亡、迁移当中都起着重要作用[16]。研究表明,外泌体中的 14-3-3η 通过与细胞膜上配体氨肽酶 N(aminopeptidase N,

APN)相互作用可以促进单核巨噬细胞 IL-1β、IL-6、TNF-α 炎性因子的表达,并且促进基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinases, MMPs) MMP-1 和 MMP-9 的表达[17]。但是,巨噬细胞本身的 14-3-3η 对巨噬细胞表型和功能的调控机制尚未知。

本研究分析了 14-3-3η 亚型在骨髓来源原代巨噬细胞不同极化状态下 mRNA 表达水平差异,发现 14-3-3η 在 M1 型巨噬细胞中表达较低,M2 型巨噬细胞中表达较高,据此推测 14-3-3η 可能参与巨噬细胞的极化。为了进一步探究 14-3-3η 参与巨噬细胞活化的分子机制,我们拟原核表达 GST-14-3-3η 蛋白。首先对 14-3-3η 蛋白氨基酸序列进行生物信息学分析,发现其二级结构中主要为 α-螺旋,说明其结构较稳定,并且疏水性较差,推测 GST-14-3-3 融合蛋白可溶性好,因此选用 BL21 常规菌株进行原核表达。其后构建 pGEX-4T-3-14-3-3η 融合表达载体,成功表达并纯化出较高纯度的 GST-14-3-3 融合蛋白,为后续在巨噬细胞中使用 GST-pull-down 实验手段研究 14-3-3 相互作用分子以及其在巨噬细胞活化和生存上的生物学功能奠定实验基础。

【参考文献】

[1] Sluchanko NN, Tugaeva KV, Greive SJ, *et al*. Chimeric 14-3-3 proteins for unraveling interactions with intrinsically disordered partners[J]. Sci Rep, 2017, 7(1): 12014. DOI: 10.1038/s41598-017-12214-9.

[2] Aguilera C, Fernández-Majada V, Inglés-Esteve J, *et al*. Efficient nuclear export of p65-IκBα complexes requires 14-3-3 proteins[J]. J Cell Sci, 2006, 119(17): 3695-3704. DOI: 10.1242/jcs.03086.

[3] Kaplan A, Bueno M, Fournier AE. Extracellular functions of 14-3-3 adaptor proteins[J]. Cell Signal, 2017, 31: 26-30. DOI: 10.1016/j.cellsig.2016.12.007.

[4] Obsil T, Obsilova V. Structural basis of 14-3-3 protein functions[J]. Semin Cell Dev Biol, 2011, 22(7): 663-672. DOI: 10.1016/j.semcdb.2011.09.001.

[5] Aghazadeh Y, Papadopoulos V. The role of the 14-3-3 protein family in health, disease, and drug development[J]. Drug Discov Today, 2016, 21(2): 278-287. DOI: 10.1016/j.drudis.2015.09.012.

[6] Zhou D, Huang C, Lin Z, *et al*. Macrophage polarization and function with emphasis on the evolving roles of coordinated regulation of cellular signaling pathways[J]. Cell Signal, 2014, 26(2): 192-197. DOI: 10.1016/j.cellsig.2013.11.004.

[7] Liu YC, Zou XB, Chai YF, *et al*. Macrophage polarization in inflammatory diseases[J]. Int J Biol Sci, 2014, 10(5): 520. DOI: 10.7150/ijbs.8879.

[8] BoseDasgupta S, Moes S, Jenoe P, *et al*. Cytokine-induced macropinocytosis in macrophages is regulated by 14-3-3ζ through its interaction with serine-phosphorylated coronin 1[J]. FEBS J, 2015, 282(7): 1167-1181. DOI: 10.1111/febs.13214.

[9] Kobayashi R, Deavers M, Patenia R, *et al*. 14-3-3 zeta protein secreted by tumor associated monocytes/macrophages from ascites of epithelial ovarian cancer patients[J]. Cancer Immunol Immunother, 2009, 58(2): 247-258. DOI: 10.1007/s00262-008-0549-7.

[10] Eufemi M, Cocchiola R, Romaniello D, *et al*. Acetylation and phosphorylation of STAT3 are involved in the responsiveness of microglia to beta amyloid[J]. Neurochem Int, 2015, 81: 48-56. DOI: 10.1016/j.neuint.2015.01.007.

[11] Sreedhar R, Arumugam S, Thandavarayan RA, *et al*. Role of 14-3-3η protein on cardiac fatty acid metabolism and macrophage polarization after high fat diet induced type 2 diabetes mellitus[J]. Int J Biochem Cell Biol, 2017, 88: 92-99. DOI: 10.1016/j.biocel.2017.05.009.

[12] Mantovani A, Biswas SK, Galdiero MR, *et al*. Macrophage plasticity and polarization in tissue repair and remodelling[J]. J Pathol, 2013, 229(2): 176-185. DOI: 10.1002/path.4133.

[13] Mantovani A, Locati M. Tumor-associated macrophages as a paradigm of macrophage plasticity, diversity, and polarization[J]. Arterioscl Throm Vas, 2013, 33(7): 1478-1483. DOI: 10.1161/ATVBAHA.113.300168.

[14] Zhou D, Yang K, Chen L, *et al*. Promising landscape for regulating macrophage polarization: epigenetic viewpoint[J]. Oncotarget, 2017, 8(34): 57693. DOI: 10.18632/oncotarget.17027.

[15] Mori M, Vignaroli G, Botta M. Small molecules modulation of 14-3-3 protein-protein interactions[J]. Drug Discov Today Technol, 2013, 10(4): e541-e547. DOI: 10.1016/j.ddtec.2012.10.001.

[16] 梨星, 霍聪, 刘艳, 等. 双去甲氧基姜黄素对星型孢菌素诱导心肌细胞凋亡的影响[J]. 中华老年多器官疾病杂志, 2017, 16(1): 56-60. DOI: 10.11915/j.issn.1671-5403.2017.01.013.

Li X, Huo C, Liu Y, *et al*. Effect of bisdemethoxycurcumin on staurosporine-induced apoptosis in cardiomyocytes[J]. Chin J Mult Organ Dis Elderly, 2017, 16(1): 56-60. DOI: 10.11915/j.issn.1671-5403.2017.01.013.

[17] Tollenaere MA, Villumsen BH, Blasius M, *et al*. p38- and MK2-dependent signalling promotes stress-induced centriolar satellite remodelling *via* 14-3-3-dependent sequestration of CEP131/AZI1[J]. Nat Commun, 2015, 6: 10075. DOI: 10.1038/ncomms10075.

(编辑: 吕青远)