

DOI:10.3969/j.issn.1672-5565.201708006

生物信息学分析 RIPK4 的分子结构与功能

刘 畅^{1,2}, 刘 安³

(1.长冶医学院 中心实验室,山西 长冶 046000;2.山西医科大学 基础医学院生物化学与分子生物学教研室,太原 030001;3.长冶医学院 附属和济医院医学科,山西 长冶 046000)

摘要:针对 RIPK4(Receptor-interacting serine/threonine kinase protein 4)结构与功能的报道较少且矛盾。本研究使用生物信息学手段,对 RIPK4 蛋白的理化性质、组织表达、亚细胞定位、信号肽和跨膜区、空间结构、蛋白质相互作用网络及序列同源性进行分析。结果表明人 RIPK4 蛋白是酸性不稳定的亲水蛋白,无信号肽和跨膜区域,定位于细胞质的可能性最大,主要二级结构为 α -螺旋和无规则卷曲,属于 PKc_like 和 ANK 超家族。经 GO 分析和 KEGG 通路分析可知,与 RIPK4 相互作用的蛋白 PHLPP1、PHLPP2、ACACA、ACACB、CNOT6L 和 CNOT6 值得深入研究,预示 RIPK4 存在更为复杂的分子功能和作用机制。为进一步研究 RIPK4 的功能提供一定的参考。

关键词:RIPK4;生物信息学;结构;功能;相互作用蛋白

中图分类号:Q71 **文献标志码:**A **文章编号:**1672-5565(2018)02-105-08

Bioinformatics analysis of the structure and function of RIPK4

LIU Chang^{1,2}, LIU An³

(1. Central Laboratory, Changzhi Medical College, Changzhi 046000, China; 2. Department of Biochemistry and Molecular Biology, Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, China; 3. Medical Department, Heji Hospital Affiliated to Changzhi Medical College, Changzhi 046000, China)

Abstract: There are scant and contradictory reports on the structure and function of RIPK4 (receptor-interacting serine / threonine kinase protein 4). In this paper, bioinformatics methods were applied to analyze the chemical properties, tissue expression, subcellular localization, signal peptide, trans-membrane region, space structure, protein interaction networks and heredity conservation of RIPK4. The results show that the RIPK4 is hydrophilic protein with unstable acidity without signal peptide and trans-membrane region, which is most likely located in cytoplasm. Its main secondary structure elements are alpha helix and random coil, and it belongs to PKc_like and ANK superfamily. GO analysis and KEGG pathway analysis show that interactive proteins PHLPP1, PHLPP2, ACACA, ACACB, CNOT6L and CNOT6 deserve further study and indicate that RIPK4 has more complex molecular functions and mechanism of action. The study provides some reference for further study of the function of RIPK4 .

Keywords: RIPK4; Bioinformatics; Structure; Function; Interactive proteins

RIPK4 最早通过酵母双杂交实验发现,是能够与蛋白激酶 C(PKC) β 1 和 PKC δ 相互作用的一种蛋白质^[1]。早期证据表明,RIPK4 能够调控表皮细胞分化,RIPK4 缺陷小鼠体内表皮细胞分化异常,围产期即会死亡^[2]。人体内 RIPK4 突变可导致常染色体隐性 Bartsocas-Papas 综合征,该病患者面部、皮

肤和四肢均有严重缺陷^[3]。

尽管已知 RIPK4 在表皮分化过程中扮演重要角色,目前关于 RIPK4 在表皮分化、肿瘤发生和侵袭转移过程中的调控机制报道较少。Huang 等^[4]发现 RIPK4 通过磷酸化 Dishevelled 蛋白调控 Wnt 信号通路,在异体移植瘤模型中,RIPK4 过量表达促进

卵巢癌发生发展。此外,在皮肤癌和结直肠癌中,RIPK4 均过量表达,推测 RIPK4 为致癌基因。然而在肝癌和舌鳞状细胞癌中,发现 RIPK4 低表达,其表达水平与细胞分化程度呈正相关,推测 RIPK4 为抑癌基因^[5-6]。

RIPK4 在肿瘤细胞侵袭转移过程中也发挥作用,此过程涉及上皮间质转化(EMT)的异常活化,受到 Wnt/ β -catenin 等多种信号通路调控。RIPK4 能够调控 293T 细胞中 Wnt/ β -catenin 信号通路,增加 β -catenin 的转录活性^[4]。在宫颈癌细胞中,抑制 RIPK4 表达能够显著抑制 EMT 途径关键调控分子(Vimentin, MMP2 和 Fibronectin)的表达,表明 RIPK4 能够促进宫颈癌细胞的侵袭转移^[7]。然而,在 Tca-8113 舌癌细胞中,RIPK4 抑制其侵袭转移^[6]。以上矛盾的研究结果预示 RIPK4 在不同肿瘤中有不同的致癌机制,也表明了 RIPK4 作用的复杂性,其分子功能和具体调控机制亟待深入研究。

此外,RIPK4 在细胞凋亡过程中也发挥作用。人舌癌细胞 Tca-8113 中过量表达 RIPK4 可调控顺铂诱导的细胞凋亡^[6]。RIPK4 能够激活 NF- κ B 和 JNK,在细胞凋亡、坏死和炎症过程中也能被 caspase 切割从而被激活^[8-9]。

本文使用生物信息学分析方法,研究 RIPK4 蛋白的理化性质和结构功能,可为进一步研究该蛋白的分子功能及作用机制提供思路。

1 材料与方法

1.1 材料

RIPK4 蛋白的序列信息来自于 NCBI 的 GenBank 数据库(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>),以“RIPK4+物种名”为关键词,搜索得到人 RIPK4 蛋白的氨基酸序列信息。

1.2 方法

1.2.1 RIPK4 理化性质分析

使用 ExPASy 数据分析系统中的 ProtParam(<http://web.expasy.org/protparam/>)工具,对 RIPK4 的分子量、分子式、酸碱性和稳定性等理化性质进行分析。使用 ProtScale 工具(<http://web.expasy.org/protscale/>)对 RIPK4 的亲疏水性进行分析。使用 SignalP 4.1(<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>)分析 RIPK4 有无切割位点和信号肽,TMHMM 2.0 工具(<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>)分析 RIPK4 的跨膜区域。

1.2.2 RIPK4 组织表达特异性和亚细胞定位预测

使用 NCBI 的 UniGene 数据库中 EST 结果对

RIPK4 在正常组织和癌组织中的表达情况进行分析。使用 PSORTII(<https://psort.hgc.jp/>)进行 RIPK4 的亚细胞定位预测。

1.2.3 RIPK4 二级结构和高级结构分析

使用 SOPMA 工具(https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/secpred_sopma.pl)预测 RIPK4 的二级结构及各成分所占比例。使用 NCBI 的 Conserved Domain 数据库分析 RIPK4 的结构域。使用 SWISS-MODEL 建模服务器(<https://swissmodel.expasy.org/>)预测三维结构。

1.2.4 相互作用蛋白预测

使用 STRING 数据库(<http://string-db.org/>),设置为高置信度 0.7,不限制数量,构建与 RIPK4 相互作用的蛋白网络。

1.2.5 RIPK4 系统进化树构建

在 NCBI 中,通过 BLASTp 搜索得到 RIPK4 在不同物种中的同源蛋白质序列。使用 Clustal2.1 软件进行 RIPK4 同源蛋白间的多重序列比对。使用 MEGA6 软件,Neighbor-joining 方法,设置 Boot-strap 分析重复数为 1 000,构建分子进化树。

2 结果与分析

通过对 RIPK4 蛋白的一级结构、二级结构、高级结构、组织表达特异性、亚细胞定位、蛋白质相互作用网络及序列同源性进行分析,旨在对 RIPK4 的分子结构与功能进行全面分析。

2.1 RIPK4 基因的编码产物分析

RIPK4 基因的染色体定位为 21q22.3,含有 8 个外显子,编码的 P57078 蛋白为 RIPK4 的共识编码序列,为 832 个氨基酸组成的多肽。转录产物经可变剪切后编码的另一种蛋白 NP_065690.2 与 P57078 相比,第 278 位到 325 位氨基酸缺失,为 784 个氨基酸组成的多肽。本文的分析对象是含有 832 个氨基酸的 RIPK4 蛋白。

2.2 RIPK4 的理化性质分析

ExPASy 数据库中的 ProtParam 在线工具预测,RIPK4 蛋白分子式为 $C_{4043}H_{6486}N_{1172}O_{1200}S_{28}$,分子量是 91 610.79 Da,其中亮氨酸含量最高,占整个序列的 13.3%。RIPK4 蛋白的理论等电点为 6.69,整个序列中带负电荷的酸性氨基酸(Asp 和 Glu)共有 101 个,带正电荷的碱性氨基酸(Arg 和 Lys)共有 95 个,因此 RIPK4 属于酸性蛋白质。RIPK4 在哺乳动物网织红细胞内半衰期为 30 h,不稳定系数为 42.09,属于不稳定蛋白质。脂肪系数为 95.07,总的平均亲水性为 -0.237。

ExPASy 数据库中的 ProtScale 在线工具预测, RIPK4 亲水性最强的位点是第 340 位的天冬氨酸, 分值为-2.522; 疏水性最强的位点是第 213 位的异亮氨酸, 分值为 2.722。由图 1 可知, RIPK4 序列中亲水区域多于疏水区域, 属于亲水蛋白质。

SignalP 4.0 预测 RIPK4 蛋白无信号肽序列(见

图 2)。原始剪切位点 C 值最高点位于第 23 位氨基酸, 分值为 0.118; 被结合的剪切点 Y 值最高点位于第 12 位氨基酸, 分值为 0.178; 信号肽 S 值最高点在 第 4 位氨基酸, 分值为 0.370; 1~11 位氨基酸序列的平均信号肽分值为 0.275, 不足以形成经典的信号肽区域。

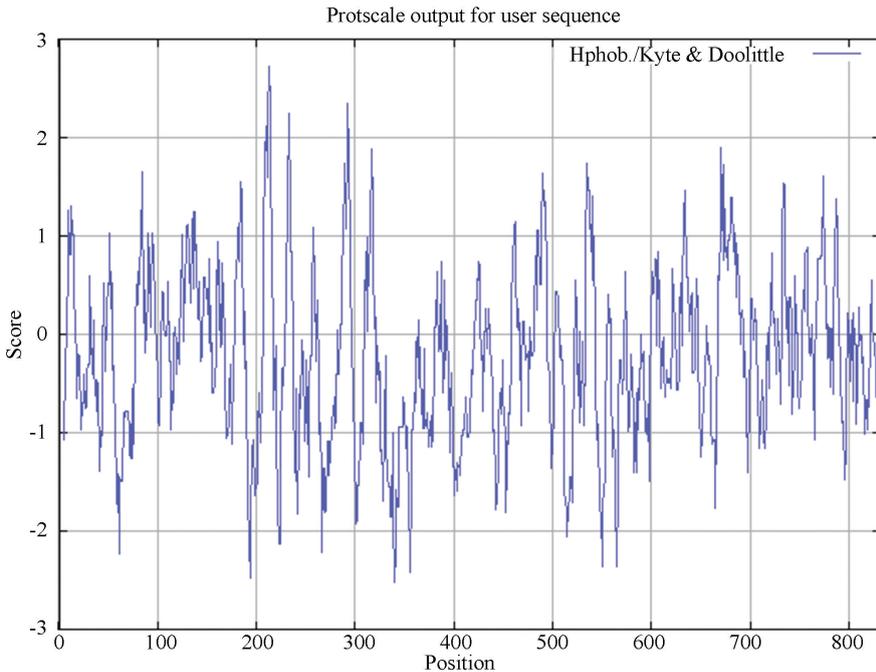


图 1 RIPK4 蛋白的亲疏水性分析

Fig.1 Hydrophilic-hydrophobic analysis of RIPK4

SignalP-4.1 prediction (euk networks): sp_P57078.1_RIPK4_HUMAN

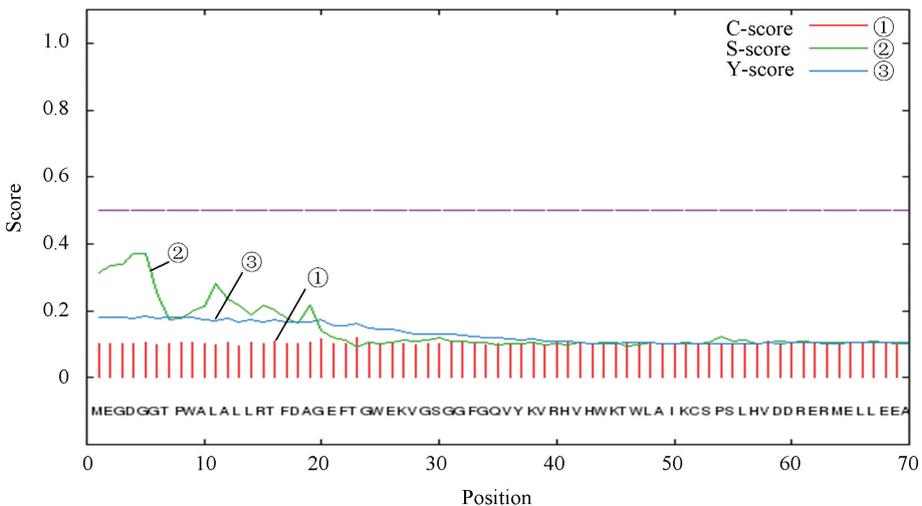


图 2 RIPK4 蛋白信号肽分析

Fig.2 Signal peptides analysis of RIPK4

TMHMM 2.0 预测 RIPK4 蛋白无跨膜结构域 (见图 3)。RIPK4 蛋白位于膜外(粉色细线)的概率几乎为 100%, 位于膜内(蓝色细线)和跨膜区域

(红色细线)的概率几乎为 0。粉色粗线代表多肽链中跨膜区域所在位置, 因 RIPK4 蛋白没有跨膜区域, 所以在粗线上不显示相应标记。

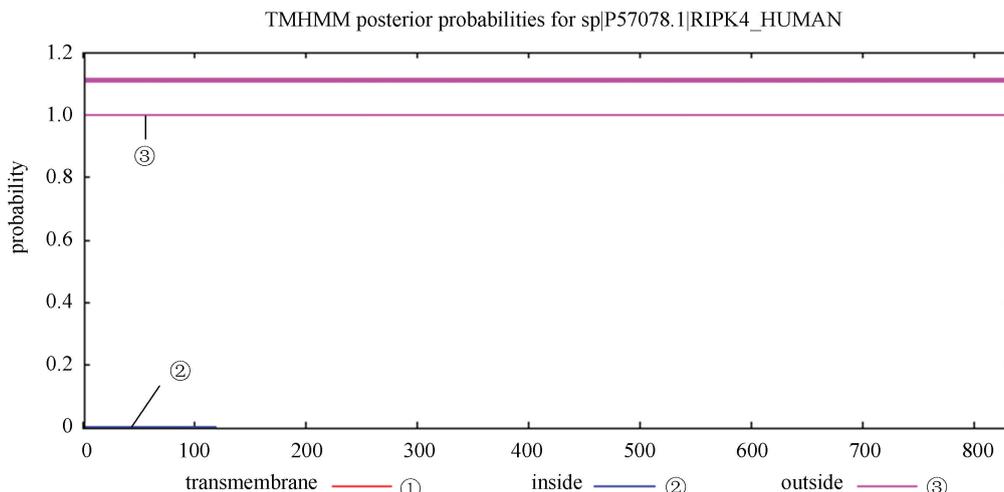


图 3 RIPK4 蛋白跨膜结构分析

Fig.3 Trans-membrane domain analysis of RIPK4

2.3 RIPK4 蛋白的组织表达特异性与亚细胞定位

NCBI 的 UniGene 数据库中 EST 结果显示, RIPK4 在以下正常组织中均有表达,拷贝数分别是:嘴 347,气管 193,甲状腺 97,肾脏 61,乳腺 46,胃 41,肺 32,肝脏 14。此外,在癌组织中也有表达,拷贝数分别是:头颈部肿瘤 201,乳腺癌 53,肝癌 20,肾癌 14,肺癌 9,结直肠癌 8。

PSORTII 预测, RIPK4 定位于细胞质的可能性

最大(60.9%),其次可能定位于细胞核(17.4%),细胞骨架(17.4%)和过氧化物酶体(4.3%)。

2.4 RIPK4 的空间结构分析

SOPMA 分析 RIPK4 的二级结构可知(见图 4), α -螺旋(图中蓝色)占 38.94%,无规卷曲(图中橙色)占 31.85%,延伸链(图中红色)占 17.67%, β -转角(图中绿色)占 11.54%。

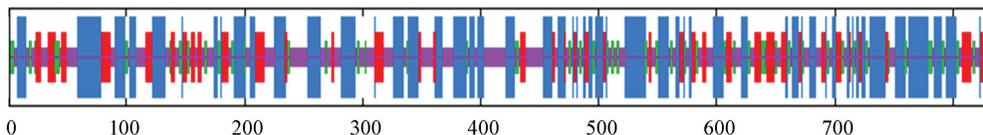


图 4 RIPK4 的二级结构分析

Fig.4 RIPK4 secondary structure analysis

NCBI 的 Conserved Domain 数据库预测 RIPK4 蛋白属于 PKc_like 超家族和锚蛋白重复序列(ankyrin repeats, ANK)超家族(见图 5)。PKc_like 超家族中的 STKc 结构域能够催化磷酸基团从 ATP 转移到蛋白底物的丝氨酸/苏氨酸残基上,从而使蛋白底物磷酸化(见图 6)。ANK 结构域常与其他结

构域同时存在,能够调控蛋白之间的相互作用。使用 SWISS-MODEL 建模服务器预测 RIPK4 蛋白三维结构(见图 6),GMQE 为 0.28, QMEAN 为 -0.78,序列与模板相似度为 42.51%,覆盖率为 40%,该模型结构合理。

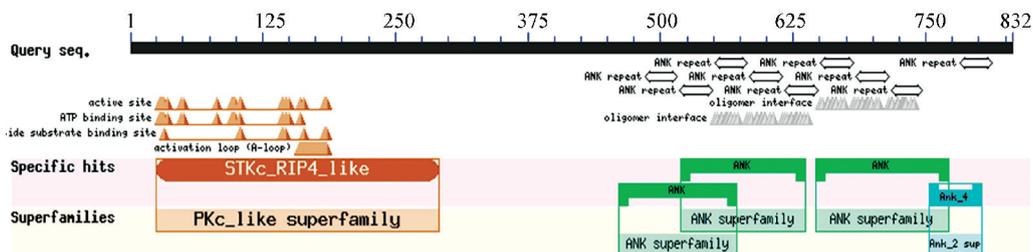


图 5 RIPK4 功能结构域分析

Fig.5 Functional domain analysis of RIPK4

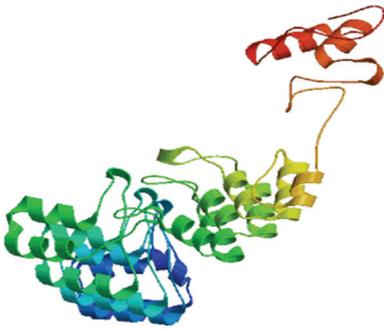


图 6 RIPK4 三维结构预测

Fig.6 Prediction of RIPK4 Three dimensional structure

2.5 RIPK4 蛋白质相互作用分析、互作蛋白基因本体 (GO) 及信号通路富集分析

使用 STRING 数据库预测与 RIPK4 相互作用的蛋白质, 设置为高置信度 0.7, 不限制数量, 构建 RIPK4 蛋白相互作用网络(见图 7)。与 RIPK4 相互作用的蛋白质主要包括 PHLPP1 (PH domain and leucine rich repeat protein phosphatase 1), PHLPP2 (PH domain and leucine rich repeat protein phosphatase 2), LRGUK (Leucine-rich repeats and guanylate kinase domain containing), 乙酰辅酶 A 羧化酶 α (acetyl-CoA carboxylase alpha, ACACA), 乙酰辅酶 A 羧化酶 β (acetyl-CoA carboxylase beta, ACACB), ASH1L (Ash1 (absent, small, or homeotic)-like (Drosophila)), UBA52 (Ubiquitin A-52 residue ribosomal protein fusion product 1), LRRK2 (Leucine-rich repeat kinase 2), CNOT6L (CCR4-NOT

transcription complex, subunit 6-like), CNOT6 (CCR4-NOT transcription complex, subunit 6)。

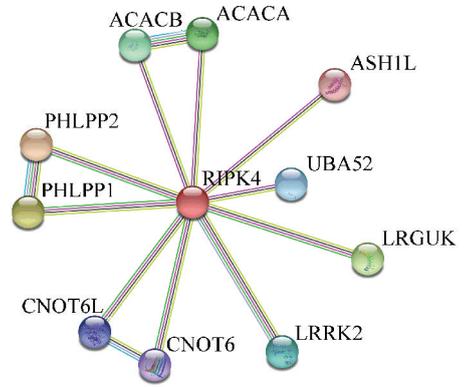


图 7 RIPK4 蛋白相互作用网络

Fig.7 Protein-protein interaction network for RIPK4

对以上互作蛋白的基因进行 GO 分析和 KEGG 通路分析。GO 分析结果表明, 互作基因富集于细胞核和 CCR4-NOT 复合体(见表 1), 参与乙酰辅酶 A 催化酶活性、离子结合和聚(A)-特异性核糖核酸酶活性等 2 个分子功能(见表 2), 涉及含磷酸基团复合物的代谢、乙酰辅酶 A 代谢、能量代谢和调节细胞质中 mRNA 加工等生物过程(见表 3)。KEGG 通路分析结果表明, 互作基因显著富集于脂肪酸生物合成、脂肪酸代谢、丙酮酸代谢和 RNA 降解等通路中(见表 4)。由此推测, RIPK4 与 PHLPP1、PHLPP2、ACACA、ACACB、CNOT6L 和 CNOT6 之间的关系值得进一步探究。

表 1 GO 细胞组成分类结果

Table 1 GO cellular component classification results

ID	细胞组成注释	基因数量/个	错误发现率
GO:0030014	CCR4-NOT 复合体	2	0.028 3
GO:0005634	细胞核	10	0.046 7

表 2 GO 分子功能分类结果

Table 2 GO molecular function classification results

ID	分子功能注释	基因数量/个	错误发现率
GO:0003989	乙酰辅酶 A 催化酶活性	2	0.001 08
GO:0003824	催化活性	10	0.004 54
GO:0004075	生物素催化酶活性	2	0.004 54
GO:0004535	聚(A)-特异性核糖核酸酶活性	2	0.005 04
GO:0043167	离子结合	10	0.013 70

2.6 RIPK4 蛋白多序列比对和进化关系分析

对不同物种 RIPK4 蛋白进行多重序列比对, 并构建分子进化树(见图 8)。人 RIPK4 蛋白的氨基酸序列与黑猩猩、猕猴、小鼠、大鼠、野猪、鸡、非洲爪蟾

和斑马鱼的相似性分别为 93.41%、92.57%、85.25%、85.13%、83.39%、70.99%、60% 和 53.67%, 与物种进化程度相一致, 表明 RIPK4 蛋白在进化过程中具有保守的分子功能。

表 3 GO 生物学过程分类结果

Table 3 GO biological process classification results

ID	生物学过程注释	基因数量/个	错误发现率
GO:0006796	含磷酸基团复合物的代谢过程	8	0.001 21
GO:2001295	丙二酰辅酶 A 生物合成过程	2	0.001 21
GO:0010606	调节细胞质中 mRNA 加工过程	2	0.010 90
GO:0006768	生物素代谢过程	2	0.015 30
GO:0006853	肉碱穿梭	2	0.015 30
GO:0006112	能量储备代谢过程	3	0.037 30
GO:0006084	乙酰辅酶 A 代谢过程	2	0.039 60

表 4 KEGG pathway 路径列表

Table 4 KEGG pathway lists

ID	路径注释	基因数量/个	错误发现率
00061	脂肪酸生物合成	2	0.001 13
00640	丙酸代谢	2	0.018 50
00620	丙酮酸代谢	2	0.019 40
01212	脂肪酸代谢	2	0.021 00
03018	RNA 降解	2	0.036 70

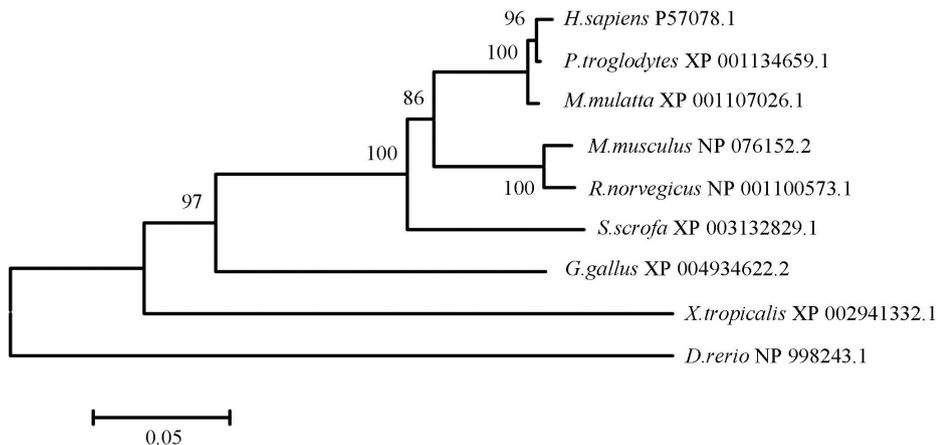


图 8 RIPK4 蛋白的分子进化树

Fig.8 The phylogenetic tree of RIPK4

3 讨论

通过生物信息学方法,分析得到 RIPK4 是酸性不稳定的亲水蛋白,无信号肽和跨膜区域,定位于细胞质的可能性最大。RIPK4 的主要二级结构是 α -螺旋,属于 PKc_like 和 ANK 超家族,有利于蛋白间相互作用的结构信息。

由 RIPK4 互作蛋白的基因 GO 分析和 KEGG 通路分析结果可知,互作基因主要参与乙酰辅酶 A 代谢和能量代谢等生物过程,显著富集于脂肪酸生物合成、脂肪酸代谢和丙酮酸代谢等通路中。因此,在 RIPK4 互作蛋白中,ACACA 和 ACACB 引起关注。

癌细胞中存在 Warburg 效应,即便在有氧条件下,癌细胞也更偏爱使用糖酵解途径进行葡萄糖代谢产生能量。目前研究发现,很多靶向 Warburg 效应的治疗方法中,癌细胞代谢可能依赖脂肪酸 β -氧化途径,而不是糖酵解途径。AMPK (AMP-activated protein kinase) 通过磷酸化乙酰辅酶 A 羧化酶 (acetyl-CoA carboxylase, ACC),抑制细胞中脂肪酸合成,促进其发生 β -氧化,从而维持胁迫条件下细胞中的能量稳态^[10-11]。ACACA 调控长链脂肪酸生物合成的限速反应^[12]。作为导管原位癌的一个潜在诊断标志物,ACACB 是一个复杂的多功能酶系统,能够调控脂肪酸氧化的催化速率。由此推测,RIPK4 与 ACACA 和 ACACB 之间的关系及参与的脂代谢过程具有一定

的研究价值,有助于阐明 RIPK4 的作用机制和生理功能。

此外,由 GO 分析结果可知,互作基因主要涉及含磷酸基团复合物的代谢等生物过程,参与催化活性等分子功能。因此,RIPK4 与 PHLPP1 和 PHLPP2 之间的关系引起关注,预示 RIPK4 存在未知分子功能和作用机制。PHLPP1 和 PHLPP2 在多种癌症中起到抑癌作用,能够抑制 PI3K/Akt 信号通路,使 Akt 的 C 末端 473 位 Ser 残基和 PKC 等其他 AGC 激酶的疏水基团发生去磷酸化,Akt 和 PKC 的酶活性受到抑制,进一步抑制细胞增殖^[13-14]。PHLPP1 和 PHLPP2 也能够激活 Mst1,促进细胞凋亡^[15]。此外,PHLPP 通过抑制 Akt 活性,促进溶酶体依赖性的整合素 $\beta 1$ 和 $\beta 4$ 降解,抑制 EMT 途径,进一步对细胞迁移起到负调控作用^[16]。RIPK4 与 PHLPP1 和 PHLPP2 之间的关系尚未见报道,本文分析得出它们之间存在相互作用,有望成为阐明 RIPK4 作用机制的突破口。

进一步,由 GO 分析和 KEGG 通路分析结果可知,互作基因参与聚(A)-特异性核糖核酸酶活性等 4 个分子功能,涉及调节细胞质中 mRNA 加工等生物过程,显著富集于 RNA 降解等通路中。因此,RIPK4 与 CNOT6L 和 CNOT6 之间的关系值得继续探究。CNOT6L 和 CNOT6 是 CCR4-NOT 复合体的亚基,该复合体是一个重要的去腺苷化酶,能降解 mRNA 的 poly(A) 尾,从而使 mRNA 发生降解,抑制翻译过程^[17]。目前尚未有关于 RIPK4 与 CNOT6L 和 CNOT6 之间关系的报道,探究它们之间的相互作用,有助于深入认识 RIPK4 的作用机制。

4 结 论

对 RIPK4 的分子结构和理化性质进行生物信息学分析,为进一步研究其生物学功能及致癌机制提供一定的参考。结论如下:

1) RIPK4 的理论分子量为 91 610.79 Da,理论等电点为 6.69,属于酸性蛋白质。RIPK4 总平均亲水性为 -0.237,不稳定系数为 42.09,属于亲水蛋白质。

2) RIPK4 的二级结构主要为 α -螺旋,属于 PKC_{like} 超家族和 ANK 超家族,无信号肽和跨膜结构域。

3) RIPK4 组织表达的特异性不强,最有可能定位于细胞质。

4) 根据系统进化树推测,人 RIPK4 蛋白在进化过程中高度保守。

5) 根据 GO 分析和 KEGG 通路分析结果推测,

RIPK4 主要涉及含磷酸基团复合物的代谢和能量代谢等生物学过程,参与催化活性和离子结合等分子功能。

参考文献(References)

- [1] CHEN L, HAIDER K, PONDA M, et al. Protein kinase C-associated kinase (PKK), a novel membrane-associated, ankyrin repeat-containing protein kinase [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2001, 276(24): 21737-21744. DOI: 10.1074/jbc.M008069200.
- [2] HOLLAND P, WILLIS C, KANALY S, et al. RIP4 is an ankyrin repeat-containing kinase essential for keratinocyte differentiation [J]. *Current Biology*, 2002, 12(16): 1424-1428.
- [3] KALAY E, SEZGIN O, CHELLAPPA V, et al. Mutations in RIPK4 cause the autosomal-recessive form of popliteal pterygium syndrome [J]. *American Journal of Human Genetics*, 2012, 90(1): 76-85. DOI: 10.1016/j.ajhg.2011.11.014.
- [4] HUANG X, MCGANN J C, LIU B Y, et al. Phosphorylation of dishevelled by protein kinase RIPK4 regulates Wnt signaling [J]. *Science*, 2013, 339(6126): 1441-1445. DOI: 10.1126/science.1232253.
- [5] HEIM D, CORNILS K, SCHULZE K, et al. Retroviral insertional mutagenesis in telomerase-immortalized hepatocytes identifies RIPK4 as novel tumor suppressor in human hepatocarcinogenesis [J]. *Oncogene*, 2015, 34(3): 364-372. DOI: 10.1038/onc.2013.551.
- [6] WANG X, ZHU W, ZHOU Y, et al. RIPK4 is downregulated in poorly differentiated tongue cancer and is associated with migration/invasion and cisplatin-induced apoptosis [J]. *International Journal of Biological Markers*, 2014, 29(2): e150-159. DOI: 10.5301/jbm.5000073.
- [7] LIU D Q, LI F F, ZHANG J B, et al. Increased RIPK4 expression is associated with progression and poor prognosis in cervical squamous cell carcinoma patients [J]. *Scientific Reports*, 2015, 5: 11955. DOI: 10.1038/srep11955.
- [8] MEYLAN E, MARTINON F, THOME M, et al. RIP4 (DIK/PKK), a novel member of the RIP kinase family, activates NF-kappa B and is processed during apoptosis [J]. *Embo Journal*, 2002, 3(12): 1201-1208. DOI: 10.1093/embo-reports/kvf236.
- [9] MEYLAN E, TSCHOPP J. The RIP kinases: crucial integrators of cellular stress [J]. *Trends in Biochemical Sciences*, 2005, 30(3): 151-159. DOI: 10.1016/j.tibs.2005.01.003.
- [10] CURRIE E, SCHULZE A, ZECHNER R, et al. Cellular fatty acid metabolism and cancer [J]. *Cell Metabolism*, 2013, 18(2): 153-161. DOI: 10.1016/j.cmet.2013.05.017.
- [11] HARDIE D G, ROSS F A, HAWLEY S A. AMPK: a nu-

- trient and energy sensor that maintains energy homeostasis [J]. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2012, 13(4): 251–262. DOI: 10.1038/nrm3311.
- [12] EUSEBI P G, GONZÁLEZ-PRENDES R, QUINTANILLA R, et al. A genome-wide association analysis for carcass traits in a commercial Duroc pig population [J]. *Animal Genetics*, 2017, 48(4): 466–469. DOI: 10.1111/age.12545.
- [13] GAO T, FURNARI F, NEWTON A C. PHLPP: a phosphatase that directly dephosphorylates Akt, promotes apoptosis, and suppresses tumor growth [J]. *Molecular Cell*, 2005, 18(1): 13–24. DOI: 10.1016/j.molcel.2005.03.008.
- [14] GAO T, BROGNARD J, NEWTON A C. The phosphatase PHLPP controls the cellular levels of protein kinase C [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2008, 283(10): 6300–6311. DOI:10.1074/jbc.M707319200.
- [15] GRZECHNIK A T, NEWTON A C. PHLPPing through history: a decade in the life of PHLPP phosphatases [J]. *Biochemical Society Transactions*, 2016, 44(6): 1675–1682. DOI:10.1042/BST20160170.
- [16] SMITH A J, WEN Y A, STEVENS P D, et al. PHLPP negatively regulates cell motility through inhibition of Akt activity and integrin expression in pancreatic cancer cells [J]. *Oncotarget*, 2016, 7(7): 7801–7815. DOI: 10.18632/oncotarget.6848.
- [17] MITTAL S, ASLAM A, DOIDGE R, et al. The Ccr4a (CNOT6) and Ccr4b (CNOT6L) deadenylase subunits of the human Ccr4-Not complex contribute to the prevention of cell death and senescence [J]. *Molecular Biology of the Cell*, 2011, 22(6): 748–758. DOI: 10.1091/mbc.E10-11-0898.