

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2018.04.002

miRNA-145 通过下调 ROCK1 的表达抑制人牙周膜成纤维细胞的迁移 *

马静雯 宋 萌[△] 潘劲松[△] 戴琳璐 魏顺峰

(上海交通大学附属第一人民医院口腔科 上海 200080)

摘要 目的:研究微小核糖核酸-145(miRNA-145, miRNA-145)对人牙周膜成纤维细胞迁移的影响及其作用机制。**方法:**体外采用酶消化法培养人牙周膜成纤维细胞并传代,将其分为对照组和转染 miRNA-145 组,按 50 ng/mL 的 miRNA-145 浓度转染人牙周膜成纤维细胞,转染 72 h 后提取各组蛋白,用 Western blot 检测 miRNA-145 的靶蛋白 ROCK1 的表达水平的相关变化;采用划痕试验检测各组划痕细胞间距离的相关变化,选取划痕后的 0 h、24 h、48 h、72 h 时间点,测量各时间点划痕细胞间的距离并计算平均值。**结果:**与对照组相比,转染 miRNA-145 后,miRNA-145 靶蛋白 ROCK1 的表达量显著降低($p<0.05$);转染 24 h、48 h 后细胞间距离的均值大于对照组($p<0.05$)。**结论:**miRNA-145 可能通过下调 ROCK1 的表达抑制人牙周膜成纤维细胞的迁移。

关键词:miRNA-145;人牙周膜成纤维细胞;细胞迁移;ROCK1

中图分类号:R-33; R781 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2018)04-606-04

miRNA-145 Inhibits the Migration of Human Periodontal Ligament Fibroblasts via Down-regulating the Expression of ROCK1 *

MA Jing-wen, SONG Meng[△], PAN Jin-song[△], DAI Lin-lu, WEI Shun-feng

(Department of stomatology, Shanghai General Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai, 200080, China)

ABSTRACT Objective: To study the effect and mechanism of miRNA-145 on the migration of human periodontal ligament fibroblasts. **Methods:** The human periodontal ligament fibroblasts were cultured by the method of enzyme digestion in vitro and gone down to the future generation. The cells were divided into two groups. The cells in experimental group were transfected with 50 ng/mL miRNA-145. The protein expression of ROCK1 was analyzed by Western Blot. Scratch test was performed to measure the changes of distances between the scratched cells at 0, 24, 48, 72 hours after scratching. **Results:** Compared with the control group, the expression level of ROCK1 was significantly lower in the experimental group($p<0.05$); and the distance between the scratched cells of experimental group was significantly higher than that of the control group at 24, 48 hours after transfection ($p<0.05$). **Conclusions:** miRNA-145 could inhibit the migration of human periodontal ligament fibroblasts via down-regulating the expression of ROCK1.

Key words: MiRNA-145; Human periodontal ligament fibroblasts; Migration; ROCK1

Chinese Library Classification(CLC): R-33; R781 **Document code:** A

Article ID:1673-6273(2018)04-606-04

前言

微小核糖核酸(miRNA, miRNA)是一类分子量为 18-25 的小分子内源性非编码 RNA,主要通过降低 mRNA 水平或者通过与靶基因的 3'-UTR 相结合抑制转录反向调控基因表达^[1-3],降低 mRNAs 的稳定性,导致蛋白的表达降低^[4]。细胞骨架肌动蛋白的重建导致细胞形态和功能的改变,包括细胞增殖、黏附和迁移^[5,6]。Rho 家族蛋白与细胞骨架肌动蛋白相互作用,参与细胞骨架重建的调控^[7]。ROCK1 是一种丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,是 Rho 蛋白下游的效应物,研究表明当 ROCK1 与 Rho 的激活 GTP 形式结合时,ROCK1 被激活,并且与细胞骨架肌动蛋白相互作用促进应力纤维和粘着斑的形成^[8]。ROCK1 可以调控细胞迁移、基板锚固和控制细胞骨架肌动蛋白重建^[9]。

由于细胞骨架肌动蛋白的重建在细胞迁移和侵袭中发挥重要作用,ROCK1 因而被认为参与细胞迁移和侵袭。

已有研究证明机械张力作用于人牙周膜细胞后 miRNA-145 的表达降低^[10],然而 miRNA-145 影响人牙周膜细胞的作用机制还不明确,且 ROCK1 已被证实是 miRNA-145 的新靶点^[8]。本研究旨在探讨 miRNA-145 是否可以通过作用于靶蛋白 ROCK1 影响人牙周膜成纤维细胞的迁移,为临床上牙齿正畸移动的现象提供更多的参考根据。

1 材料与方法

1.1 主要材料

人牙周膜成纤维细胞(酶消化法体外培养)、DMEM 培养基(源培生物有限公司,上海)、胎牛血清(Gibco 公司,美国)、0.25

* 基金项目:国家自然科学基金项目(11172177);上海交通大学医工交叉基金项目(YG2010MS07)

作者简介:马静雯(1991-),硕士研究生,电话:15000052660, E-mail: majingwen0101@126.com

[△] 通讯作者:宋萌,教授,电话:13386259556, E-mail: smgjzh160@sohu.com;

潘劲松,主任医师,电话:13311986317, E-mail: pip0003@163.com

(收稿日期:2017-06-08 接受日期:2017-06-30)

%胰蛋白酶(源培生物有限公司,上海)、miRNA-145 模拟物(锐博生物科技有限公司,广州)、脂质体转染试剂 lipofectamine™ 2000(锐博生物科技有限公司,广州)、抗体(Proteintech 公司,美国)。

1.2 实验方法

1.2.1 人牙周膜成纤维细胞培养及传代 采用酶消化法体外培养人牙周膜成纤维细胞并传代。选取临床上拔除的健康正畸牙齿(前磨牙最好),放入含双抗(链霉素 100 mg/L、青霉素 100 mg/L)的无菌 PBS 溶液中,带至超净台再用含双抗的无菌 PBS 溶液冲洗数次,用无菌手术刀片刮取根中 1/3 的牙周膜,加入 I 型胶原酶(1 g/L)处理牙周膜 20 min,离心,将沉淀均匀放入 25 mL 培养瓶中,加入含双抗及 10 %胎牛血清的 DMEM 培养液,将培养瓶放入含 5 %CO₂、37 °C 的培养箱中孵育。10 天后可以看到有梭形细胞从组织块爬出,待细胞长至培养瓶的 90 %以上时进行传代,然后采用角蛋白和波形蛋白染色对人牙周膜成纤维细胞进行鉴定。取其第 4-8 代进行实验。

1.2.2 细胞接种及转染 取生长良好的人牙周膜成纤维细胞将其按 1×10^6 个接种于 6 孔板,加入不含双抗、含 5 %胎牛血清的 DMEM 培养液,将其置于含 5 %CO₂、37 °C 的培养箱中孵育,待细胞长至 80 %左右时根据制造商的指示使用脂质体转染试剂 lipofectamine™ 2000 对细胞进行转染。Has-miR-145-3p 模拟物序列:正义链(5',-3')GGAUCCUGGAAAUACUGUUCU,反义链(5',-3') AGAACAGUAUUCCAGGAAUCC,将细胞分为对照组及 miRNA-145 转染组,按 50 ng/mL 的浓度转染细胞,转染 6 h 后弃去转染培养基更换含血清、不含抗生素的完全培养基,置于含 5 %CO₂、37 °C 培养箱中继续培养,细胞培养 72 h 后进行进一步检测。

1.2.3 蛋白免疫印迹法 转染 72 h 后,用全细胞裂解液提取对照组及 miRNA-145 转染组的人牙周膜成纤维细胞蛋白质,用蛋白免疫印迹法检测 miRNA-145 的靶蛋白 ROCK1 的表达量,以 GAPDH 作为内参。一抗浓度:ROCK1(1:1000)、GAPDH (1:5000),荧光二抗鼠抗浓度(1:12000)、荧光二抗兔抗浓度(1:10000),用 Bio-rad 图像扫描分析系统进行光密度积分值分析来做统计分析。

1.2.4 划痕试验 分别对对照组及 miRNA-145 转染组的人牙周膜成纤维细胞做划痕试验。吸去原有培养液并用无菌 PBS 液冲洗两次,用 200 μ L 的无菌枪头沿着直尺在每孔细胞各划一条水平及垂直的光滑的直线,交点位于孔的中央位置,用 PBS 冲洗 3 次,去除划掉的细胞,加入低血清培养基,放入含 5 % CO₂、37 °C 的培养箱中孵育,选取 0 h、24 h、48 h、72 h 时间点取样拍照,测量并计算划痕细胞间距离的平均值进行统计学分析。

1.3 统计学分析

采用 SPSS19.0 软件对数据进行统计学分析。计量资料均采用均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,两组数据间的差异采用 Students t 检验,以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 人牙周膜成纤维细胞的培养

正常状态下,人牙周膜成纤维细胞呈长梭形,见图 1。

2.2 转染 miRNA-145 对人牙周膜成纤维细胞 ROCK1 表达的

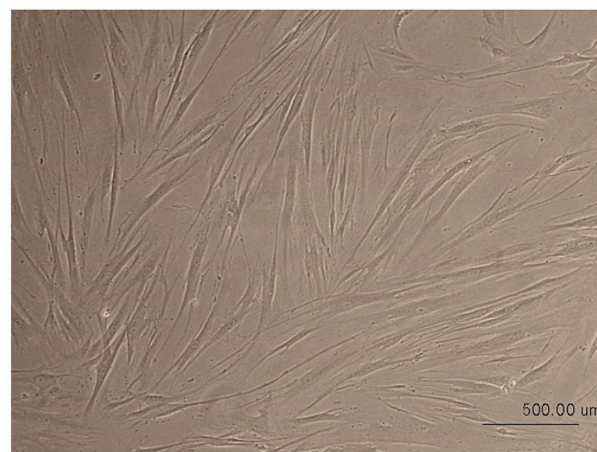


图 1 正常状态的人牙周膜成纤维细胞($\times 100$)

Fig.1 Human periodontal ligament fibroblasts in the normal state($\times 100$)

影响

蛋白免疫印迹结果显示:miRNA-145 转染的人牙周膜成纤维细胞 ROCK1 蛋白的表达显著低于对照组,两组比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。

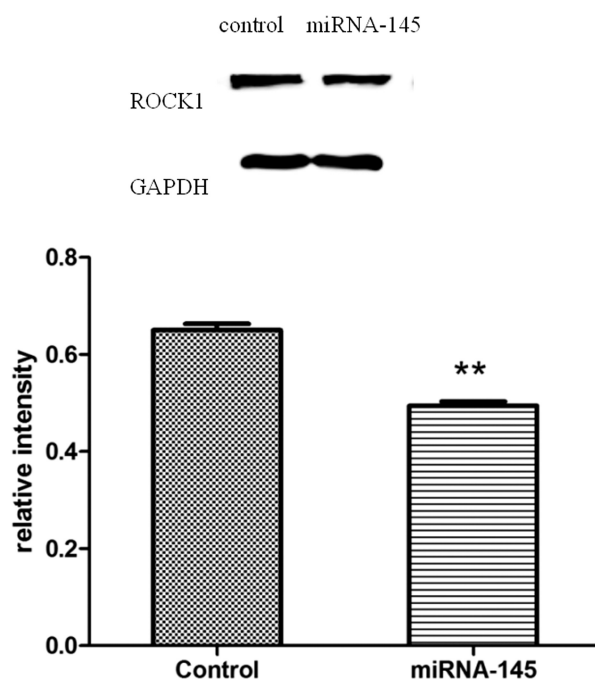


图 2 转染 miRNA-145 对人牙周膜成纤维细胞 ROCK1 表达的影响

Fig.2 Effect of transfection with miRNA-145 on the ROCK1 expression in the Human periodontal ligament fibroblasts

Note: **: compared with the control group, $P < 0.05$.

2.3 转染 miRNA-145 对人牙周膜成纤维细胞迁移的影响

划痕试验结果表明转染 miRNA-145 后划痕细胞间的距离大于未转染 miRNA-145 细胞间的距离。转染后 24 h、48 h 时,对照组划痕细胞间的距离明显低于 miRNA-145 转染组($P < 0.05$)。

3 讨论

miRNA 是一组分子量为 18-25 的广泛存在于真核生物中的内源性非编码单链小分子 RNA,具有高度的时序性、保守性

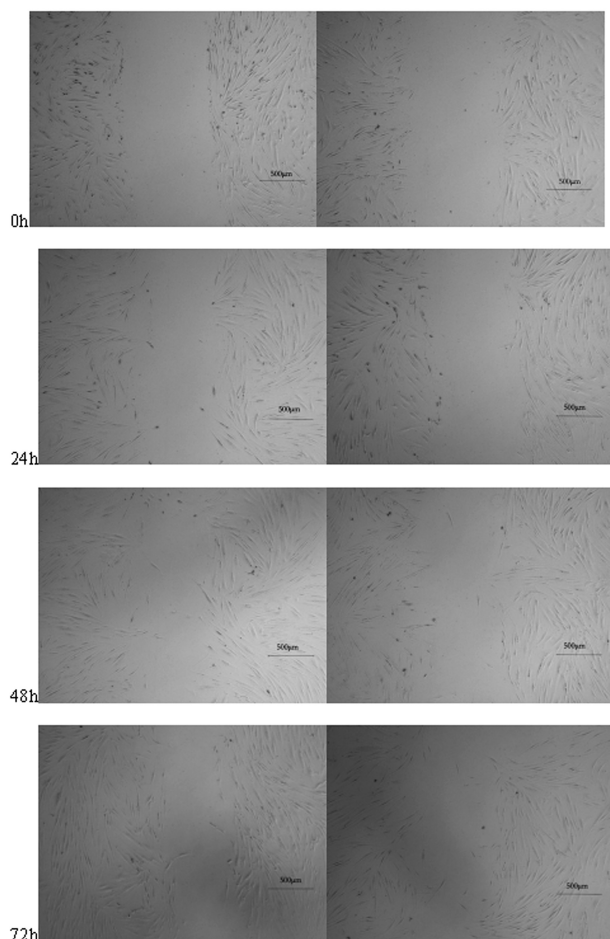
图3 划痕试验人牙周膜成纤维细胞迁移情况($\times 40$)Fig. 3 Migration of human periodontal ligament fibroblasts by scratch test ($\times 40$)表1 两组不同时点细胞间距离(mm)比较($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Comparison of the distances between cells of the two groups at different time points

Groups	N	0 h	24 h	48 h	72 h
Control	3	1.02 $\pm$ 0.03	0.89 $\pm$ 0.04	0.78 $\pm$ 0.01	0.74 $\pm$ 0.05
miRNA-145	3	1.03 $\pm$ 0.02	1.01 $\pm$ 0.01&	0.83 $\pm$ 0.02&	0.73 $\pm$ 0.06
P		0.504	0.007	0.023	0.834

Note: &: compared with the control group, $P < 0.05$.

和组织特异性。目前研究表明超过三分之一的蛋白质编码基因可能均由 miRNAs 控制^[11],而且 miRNAs 在协调一系列生物过程中发挥关键作用,包括分化、细胞增殖、血管生成和新陈代谢等^[12-15]。以往众多研究证实 miRNAs 通过作用于相对应的靶基因调控靶蛋白的表达水平,从而能够在细胞生物学过程中发挥重要作用,且 miRNAs 对细胞迁移及侵袭起关键的调控作用。徐驰^[16]通过实验研究证明 miRNA-145 可以通过调控 Klf4、Oct4 来抑制 A549 肺癌细胞的侵袭及转移。刘会芳^[17]等也发现 miRNA-145 可以抑制人结肠癌细胞系 Caco-2 细胞的迁移。黄若兰^[18]等研究证实 miRNA-145 介导骨髓间充质干细胞膜微粒减少血管平滑肌细胞迁移。由此可见,miRNA-145 涉及到生命活动的各个方面。

牙周膜是一种位于牙骨质与牙槽骨之间、包含有血管网的

纤维结缔组织,在正畸牙齿移动过程中,作用于牙齿的机械力通过牙周膜传递到牙槽骨,引起牙周膜细胞改变,最终使受压侧牙槽骨吸收,牵张侧牙槽骨增生,牙齿移动,而牙周膜中最主要的细胞是成纤维细胞,因此研究牙周膜成纤维细胞形态及功能的变化可以更好地解释正畸牙齿移动过程的机制。课题组前期研究表明对人牙周膜成纤维细胞施加机械力后可以通过 Rho 信号通路改变牙周膜成纤维细胞骨架,引起细胞骨架重建^[19,20],且在 SD 大鼠动物实验中得到了验证^[21]。机械力、炎症、缺氧等多种刺激因素都可以活化 Rho/Rho 激酶通路,将与 GDP 结合的生活状态的 Rho 蛋白转变为与 GTP 结合的活化状态的 Rho 蛋白,并且发生膜转位,即游离在细胞质中的 Rho 蛋白向细胞膜聚集并结合于细胞膜,这样活化的 Rho 蛋白就可以将刺激信号传递给其下游的效应分子 Rho 激酶,使其多个位点,如 854 位丝氨酸和 697 位苏氨酸发生磷酸化而激活,并进一步活化其下游信号分子^[22]。ROCK1 通过与 Rho 的激活 GTP 结合形式相结合被激活,进一步与细胞骨架肌动蛋白相互作用,而且 ROCK1 还被报道可以提供反馈机制,调节上游蛋白 Rac1 和 RhoA 的活动,而 Rac1 和 RhoA 在细胞骨架肌动蛋白重建中发挥重要作用^[23]。因此,ROCK1 在细胞骨架重建中具有关键作用^[11],而细胞骨架重排与正畸过程中牙齿移动有着紧密的联系。Cofilin 是一种能够直接调节细胞骨架肌动蛋白聚合和解聚的蛋白,Cofilin 磷酸化后能抑制 F-actin 解聚,使肌动蛋白由 G-actin 转变为 F-actin,而 LIMK 磷酸化后能够对 Cofilin 磷酸化起到正向作用,进一步使 Cofilin 磷酸化被激活^[24]。LIMK 是 ROCK 的下游蛋白,ROCK 可使 LIMK1 和 LIMK2 磷酸化^[25]。有研究证实对人牙周膜成纤维细胞施加机械力 6 h、24 h 后,ROCK 和 p-cofilin 的表达水平都升高,而在施加机械力前使用 ROCK 特异性抑制剂 Y-27632 处理人牙周膜成纤维细胞,其

p-cofilin 表达水平降低^[22]。ROCK 可以通过复杂的磷酸化 / 去磷酸化级联反应来调节细胞骨架肌动蛋白聚合及解聚,控制多种细胞生物学行为^[26]如增殖、凋亡、移动、趋化、黏附和收缩。

F.L.Weia,d^[10]等通过实验证实与未加力的细胞相比,施加牵张力的牙周膜干细胞 miRNA 表达有所不同,其中 26 种 miRNA 表达上调,27 种 miRNA 表达下降,下调的 miRNA 中包括 miRNA-145,因此 miRNA-145 参与正畸牙齿移动过程。然而,miRNA-145 参与正畸牙齿移动过程的机制尚不明确。ROCK1 被证实是 miRNA-145 的一个新的靶蛋白,可以抑制胶质瘤细胞迁移^[8]。赵莹^[27]等通过 siRNA 技术下调血管平滑肌中 ROCK1 和 ROCK2 基因后,相应的蛋白表达水平也下降,而 ROCK1 明显抑制了 PDGF 诱导的血管平滑肌细胞的迁移,而 ROCK2 无明显影响,表明 ROCK1 在血管平滑肌细胞迁移过

程中起主导作用。研究已经证实 Rho/ROCK 信号通路参与到调控细胞骨架过程中并且是细胞运动的关键^[28]。本研究旨在证实 miRNA-145 是否可以通过作用于靶蛋白 ROCK1 而影响人牙周膜细胞迁移,我们将 miRNA-145 转染入人牙周膜成纤维细胞,使用蛋白免疫印迹法检测转染结果及 miRNA-145 的靶蛋白 ROCK1 的表达水平,划痕试验检测 miRNA-145 对人牙周膜成纤维细胞迁移的影响,结果显示:miRNA-145 成功转入人牙周膜成纤维细胞并且下调靶蛋白 ROCK1 的表达,且具有显著差异;在划痕试验后的 24 h、48 h 时点,转染 miRNA-145 的划痕细胞间的距离显著大于对照组,而 72 h 时点相比无显著差异,在 48 h 内 miRNA-145 对人牙周膜成纤维细胞的作用明显,48 h 后作用不显著,可能与转染时间、细胞状态及转染浓度等因素有一定的关系,还需要实验进一步证实,但结果提示 miRNA-145 在一定程度上抑制人牙周膜成纤维细胞迁移。Lei P^[29]等通过实验证实 ROCK1 过表达可以反转 miRNA-145 对骨肉瘤细胞侵袭的抑制作用,miRNA-145 明显抑制骨肉瘤细胞中 ROCK1 的蛋白表达水平。Stiles JM^[30]等通过敲除血管内皮细胞的 ROCK 基因后检测 miRNA 表达水平,发现部分 miRNA 表达水平发生改变,推测 ROCK 与 miRNA 之间有着密不可分的联系,但其与人牙周膜成纤维细胞 miRNA-145 之间的相互作用需要进一步实验验证。

miRNA-145 调控 ROCK1 蛋白表达,而 ROCK1 蛋白表达造成细胞骨架重排,降低细胞表面张力,抑制人牙周膜成纤维细胞迁移。本实验结果表明 miRNA-145 可能通过下调 ROCK1 的表达抑制人牙周膜成纤维细胞的迁移,进一步阐明了牙齿移动的作用机制。

参考文献(References)

- [1] Yates LA, Norbury CJ, Gilbert RJ. The long and short of microRNA [J]. Cell, 2013, 153(3): 516-519
- [2] Nagadia R, Pandit P, Coman WB, et al. miRNAs in head and neck cancer revisited[J]. Cell Oncol (Dordr), 2013, 36(1): 1-7
- [3] Hobert O. Gene regulation by transcription factors and microRNAs[J]. Science, 2008, 319(5871): 1785-1786
- [4] Eulalio A, Huntzinger E, Izaurralde E. Getting to the Root of miRNA-Mediated Gene Silencing[J]. Cell, 2008, 132(1): 9-14
- [5] Chen RH, Wang WJ, Kuo JC. The tumor suppressor DAP-kinase links cell adhesion and cytoskeleton reorganization to cell death regulation [J]. J Biomed Sci, 2006, 13(2): 193-199
- [6] Becart S, Altman A. SWAP-70-like adapter of T cells: a novel Lck-regulated guanine nucleotide exchange factor coordinating actin cytoskeleton reorganization and Ca²⁺ signaling in T cells[J]. Immunol Rev, 2009, 232(1): 319-333
- [7] Hall A. Rho family GTPases [J]. Biochem Soc Trans, 2012, 40(6): 1378-1382
- [8] Wan X, Cheng Q, Peng R, et al. ROCK1, a novel target of miR-145, promotes glioma cell invasion[J]. Molecular Medicine Reports, 2014, 9(5): 1877-1882
- [9] Zheng M, Sun X, Li Y, et al. MicroRNA-145 inhibits growth and migration of breast cancer cells through targeting oncoprotein ROCK1[J]. Tumor Biol, 2016, 37(6): 8189-8196
- [10] Wei FL, Wang JH, Ding G, et al. Mechanical Force-Induced Specific MicroRNA Expression in Human Periodontal Ligament Stem Cells [J]. Cells Tissues Organs, 2014, 199(5-6): 353-363
- [11] Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function[J]. Cell, 2004, 116(2): 281-297
- [12] Xu Y, Zhao F, Wang Z, et al. MicroRNA-335 acts as a metastasis suppressor in gastric cancer by targeting Bcl-w and specificity protein 1[J]. Oncogene, 2012, 31(11): 1398-1407
- [13] Deng X, Wu B, Xiao K, et al. MiR-146b-5p promotes metastasis and induces epithelial-mesenchymal transition in thyroid cancer by targeting ZNF3[J]. Cell Physiol Biochem, 2015, 35(1): 71-82
- [14] Li D, Jian W, Wei C, et al. Down-regulation of miR-181b promotes apoptosis by targeting CYLD in thyroid papillary cancer [J]. Int J Clin Exp Pathol, 2014, 7(11): 7672-7680
- [15] Zhang X, Li M, Zuo K, et al. Upregulated miR-155 in papillary thyroid carcinoma promotes tumor growth by targeting APC and activating Wnt/ β -catenin signaling [J]. J Clin Endocrinol Metab, 2013, 98(8): E1305-1313
- [16] 徐驰. microRNA-145 调控 Klf4 和 Oct4 对肺癌细胞生物学行为的影响[D]. 上海: 第二军医大学, 2014: 1-118
Xu Chi. Effects of microRNA-145 regulation of Klf4 and Oct4 on the biological behavior of lung cancer cells [D]. Shanghai: Second Military Medical University, 2014: 1-118
- [17] 刘会芳, 李健, 韩双印, 等. microRNA-145 对人结肠癌 Caco-2 细胞生物学行为的影响[J]. 新乡医学院学报, 2016, 33(3): 186-189
Liu Hui-fang, Li Jian, Han Shuang-yin, et al. Effects of microRNA-145 on biological behaviour of colon cancer Caco-2 cells [J]. Journal of Xinxiang Medical University, 2016, 33(3): 186-189
- [18] 黄若兰, 张忠, 陈铭泰, 等. miRNA-145 介导骨髓间充质干细胞膜微粒减少血管平滑肌细胞迁移[J]. 东南大学学报(医学版), 2016, 35(4): 475-481
Huang Ruo-lan, Zhang Zhong, Chen Ming-tai, et al. Bone marrow mesenchymal stem cell microparticles reduce the migration of vascular smooth muscle cells through miRNA-145 [J]. J Southeast Univ(Med Sci Ed), 2016, 35(4): 475-481
- [19] 潘劲松, 王莉, 汪廷乐, 等. Rho 信号通路在周期性张应力诱导人牙周膜细胞骨架重排中的作用 [J]. 广东牙病防治, 2014, 22(6): 289-293
Pan Jin-song, Wang Li, Wang Ting-le, et al. Rho plays a key role in cyclic strain induced cytoskeletal rearrangement of human periodontal ligament cells [J]. Journal of Dental Prevention and Treatment, 2014, 22(6): 289-293
- [20] Pan J, Wang T, Wang L, et al. Cyclic Strain-Induced Cytoskeletal Rearrangement of Human Periodontal Ligament Cells via the Rho Signaling Pathway[J]. PLoS ONE, 2014, 9(3): e91580
- [21] Meng R, Song M, Pan J. Rho is involved in periodontal tissue remodeling with experimental tooth movement in rats [J]. Arch Oral Biol, 2015, 60(6): 923-931
- [22] 杨张娅, 刘斌. ROCK 信号通路在血管平滑肌细胞增殖和迁移作用中的研究进展[J]. 实用心脑血管病杂志, 2013, 21(3): 10-12
Yang Zhang-ya, Liu Bin. Progress study of ROCK signaling pathway in the proliferation and migration of vascular smooth muscle cells[J]. Practical Journal of Cardiac Cerebral Pneumal and Vascular Disease, 2013, 21(3): 10-12

- p53 modulation of viral DNA amplification in organotypic cultures [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2013, 110(19): 7542-7549
- [4] Howie H L, Katzenellenbogen R A, Galloway D A. Papillomavirus E6 proteins[J]. *Virology*, 2009, 384(2): 324-334
- [5] Ronchi V P, Klein J M, Edwards D J, et al. The active form of E6-associated protein (E6AP)/UBE3A ubiquitin ligase is an oligomer [J]. *J Biol Chem*, 2014, 289(2): 1033-1048
- [6] Cherry J J, Rietz A, Malinkevich A, et al. Structure based identification and characterization of flavonoids that disrupt human papillomavirus-16 E6 function[J]. *PLoS One*, 2013, 8(12): e84506
- [7] Zanier K, Stutz C, Kintscher S, et al. The E6AP binding pocket of the HPV16 E6 oncoprotein provides a docking site for a small inhibitory peptide unrelated to E6AP, indicating druggability of E6 [J]. *PLoS One*, 2014, 9(11): e112514
- [8] Martinez-Zapien D, Ruiz F X, Poirson J, et al. Structure of the E6/E6AP/p53 complex required for HPV-mediated degradation of p53[J]. *Nature*, 2016, 529(7587): 541-545
- [9] Malecka K A, Fera D, Schultz D C, et al. Identification and characterization of small molecule human papillomavirus E6 inhibitors[J]. *ACS Chem Biol*, 2014, 9(7): 1603-1612
- [10] Sali A, Blundell T L. Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints[J]. *J Mol Biol*, 1993, 234(3): 779-815
- [11] MacArthur M W, Driscoll P C, Thornton J M. NMR and crystallography--complementary approaches to structure determination[J]. *Trends Biotechnol*, 1994, 12(5): 149-153
- [12] O'Meara M J, Leaver-Fay A, Tyka M D, et al. Combined covalent-electrostatic model of hydrogen bonding improves structure prediction with Rosetta [J]. *J Chem Theory Comput*, 2015, 11 (2): 609-622
- [13] Gopalakrishnan K, Sowmiya G, Sheik S S, et al. Ramachandran plot on the web (2.0)[J]. *Protein Pept Lett*, 2007, 14(7): 669-671
- [14] Kolaskar A S, Sawant S. Prediction of conformational states of amino acids using a Ramachandran plot [J]. *Int J Pept Protein Res*, 1996, 47 (1-2): 110-116
- [15] Pronk S, Pall S, Schulz R, et al. GROMACS 4.5: a high-throughput and highly parallel open source molecular simulation toolkit [J]. *Bioinformatics*, 2013, 29(7): 845-854
- [16] Maier J A, Martinez C, Kasavajhala K, et al. ff14SB: Improving the Accuracy of Protein Side Chain and Backbone Parameters from ff99SB[J]. *J Chem Theory Comput*, 2015, 11(8): 3696-3713
- [17] 康文渊, 徐锡明, 郭建秀, 等. 分子动力学模拟残基突变对芳香烃受体配体结合区的影响[J]. *化学通报*, 2017, (02): 179-184
- Kang Wen-yuan, Xu Xi-ming, Guo Jian-xiu, et al. Molecular Dynamics Studies on the Structure of Aryl Hydrocarbon Receptor Fragment Affected by Site-Directed Mutagenesis [J]. *Chemistry*, 2017 (02): 179-184
- [18] Skjaerven L, Jariwala S, Yao X Q, et al. Online interactive analysis of protein structure ensembles with Bio3D-web [J]. *Bioinformatics*, 2016, 32(22): 3510-3512
- [19] McGibbon R T, Beauchamp K A, Harrigan M P, et al. MDTraj: A Modern Open Library for the Analysis of Molecular Dynamics Trajectories [J]. *Biophys J*, 2015, 109(8): 1528-1532
- [20] Nicolau N J, Giuliatti S. Modeling and molecular dynamics of the intrinsically disordered e7 proteins from high- and low-risk types of human papillomavirus[J]. *J Mol Model*, 2013, 19(9): 4025-4037
- [21] Martinez-Zapien D, Ruiz F X, Poirson J, et al. Structure of the E6/E6AP/p53 complex required for HPV-mediated degradation of p53[J]. *Nature*, 2016, 529(7587): 541-545
- [22] Zanier K, Charbonnier S, Sidi A O, et al. Structural basis for hijacking of cellular LxxLL motifs by papillomavirus E6 oncoproteins [J]. *Science*, 2013, 339(6120): 694-698
- [23] Baker E N, Hubbard R E. Hydrogen bonding in globular proteins [J]. *Prog Biophys Mol Biol*, 1984, 44(2): 97-100
- [24] Karlsson O A, Ramirez J, Oberg D, et al. Design of a PDZbody, a bivalent binder of the E6 protein from human papillomavirus [J]. *Sci Rep*, 2015, 5: 9382

(上接第 609 页)

- [23] Schofield AV, Bernard O. Rho-associated coiled-coil kinase (ROCK) signaling and disease [J]. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 2013, 48(4): 301-316
- [24] Arber S, Barbayannis FA, Hanser H, et al. Regulation of actin dynamics through phosphorylation of cofilin by LIM-kinase [J]. *Nature*, 1998, 393(6687): 805-809
- [25] Ren XD, Wang R, Li Q, et al. Disruption of Rho signal transduction upon cell detachment [J]. *Journal of Cell Science*, 2004, 117 (6): 3511-3518
- [26] Abouzahr Rifai S, Hasmim M, Boukerche H, et al. Resistance of tumor cells to cytolytic T lymphocytes involves Rho-GTPases and focal adhesion kinase activation [J]. *J Biol Chem*, 2008, 283 (46): 31665-31667
- [27] 赵莹, 杨福春, 魏晓晴, 等. ROCK I /II 基因下调对血管平滑肌细胞迁移及增殖的影响 [J]. *现代生物医学进展*, 2009, 9 (17): 3232-3234+3271
- Zhao Ying, Yang Fu-chun, Wei Xiao-qing, et al. Effects of ROCK I / II gene expression down-regulated on migration and proliferation of vascular smooth muscle cells [J]. *Progress in Modern Biomedicine*, 2009, 9(17): 3232-3234+3271
- [28] An L, Liu Y, Wu A, et al. microRNA-124 Inhibits Migration and Invasion by Down- Regulating ROCK1 in Glioma [J]. *PLoS ONE*, 2013, 8(7): e69478
- [29] Lei P, Xie J, Wang L, et al. microRNA-145 inhibits osteosarcoma cell proliferation and invasion by targeting ROCK1 [J]. *Mol Med Rep*, 2014, 10(1): 155-160
- [30] Stiles JM, Kurisetty V, Mitchell DC, et al. Rho kinase proteins regulate global miRNA expression in endothelial cells [J]. *Cancer Genomics Proteomics*, 2013, 10(6): 251-263