

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2020.13.001

· 基础研究 ·

敲除含 α -Arrestin 结构域蛋白 3 对肾癌细胞 PI3K/AKT 信号通路及增殖能力的影响*陈暮霖¹ 穆星宇¹ 李维国¹ 蒋立人² 凡 杰^{1Δ}

(1 上海交通大学附属第一人民医院泌尿外科 上海 200080; 2 上海交通大学附属第一人民医院病理科 上海 200080)

摘要 目的: 探究敲除含 α -Arrestin 结构域蛋白 3 (α -Arrestin-Domain-Containing-3, ARRDC3) 对肾透明细胞癌 786-O 细胞 PI3K/AKT 信号通路和增殖能力的影响及作用机制。**方法:** 使用 Crispr-Cas9 技术构建稳定敲除 ARRDC3 的 786-O 细胞系; 通过免疫印迹检测敲除 ARRDC3 对 AXL 蛋白水平的影响; 借助免疫沉淀技术研究敲除 ARRDC3 对 AXL 泛素化水平的影响; 利用免疫印迹、shRNA 干扰蛋白表达技术和及构建的敲除 ARRDC3 细胞检测 ARRDC3 和 AXL 表达水平对 PI3K/AKT 信号通路活性的影响; CCK-8 技术检测 ARRDC3 和 AXL 表达水平对肾癌细胞增殖能力的影响。**结果:** 与野生型 786-O 细胞相比, 稳定敲除 ARRDC3 的 786-O 细胞内 AXL 的蛋白水平显著升高。进一步检测细胞内 AXL 的泛素化水平发现, ARRDC3 稳定敲除组细胞内 AXL 蛋白的泛素化水平显著降低; 免疫印迹和 CCK-8 实验结果显示, 敲除 ARRDC3 会显著增加 AXL/PI3K/AKT 信号通路磷酸化和细胞增殖能力, 而在 ARRDC3 缺陷细胞内降低 AXL 蛋白的表达, 会导致 AXL/PI3K/AKT 的活性和细胞增殖能力恢复到与野生型相似的水平。**结论:** 在 786-O 细胞内敲除 ARRDC3 可通过降低 ARRDC3 对 AXL 的泛素化降解, 上调 AXL 蛋白水平和 PI3K/AKT 信号通路的活性, 并促进肾癌细胞的增殖。

关键词: ARRDC3; AXL; 信号通路; 增殖; 肾细胞癌**中图分类号:** R-33; R737.11 **文献标识码:** A **文章编号:** 1673-6273(2020)13-2401-05Effects of α -Arrestin-Domain-Containing-3 Deficiency on PI3K/AKT Signaling Pathway and Proliferation of Renal Cell Carcinoma Cells*CHEN Mu-lin¹, MU Xing-yu¹, LI Wei-guo¹, JIANG Li-ren², FAN Jie^{1Δ}

(1 Department of Urology, Shanghai General Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai, 200080, China;

2 Department of Pathology, Shanghai General Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai, 200080, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the effects and mechanisms of α -Arrestin-domain-containing-3 (ARRDC3) deficiency on PI3K/AKT signaling pathway and cell proliferation in clear cell renal cell carcinoma 786-O cells. **Methods:** Crispr-Cas9 system was used to construct the ARRDC3 deficient 786-O cell line. The effect of ARRDC3 deficiency on AXL protein was detected by Western Blotting analysis. The effect of ARRDC3 deficiency on the ubiquitination of AXL was investigated by Immunoprecipitation. Effects of ARRDC3 and AXL expression on PI3K/AKT signaling pathway were detected by Western Blotting, shRNA interference and established ARRDC3 deficient cells. CCK-8 technology was utilized to discovered the effect of ARRDC3 and AXL expression on proliferation in RCC cells. **Results:** Compared with wild type 786-O RCC cells, the protein of AXL was elevated. Further examination of ubiquitination indicated that ARRDC3 deficiency significantly reduced the ubiquitination of AXL in 786-O cells. The results of Western blotting and CCK-8 analyses showed that ARRDC3 deficiency increased the phosphorylation of AXL/PI3K/AKT signaling pathway and cell proliferation ability. Moreover, knocking down AXL protein expression in ARRDC3-deficient cells led the activity of AXL/PI3K/AKT signaling pathway and cell proliferation back to the levels similar to wild type, which suggested the effects of ARRDC3 deficiency on the activity of AXL/PI3K/AKT signaling pathway and proliferation of RCC cells is AXL-dependent. **Conclusions:** ARRDC3 deficiency in 786-O cells up-regulates AXL protein level and activity of the PI3K/AKT signaling pathway and promotes proliferation of cells via reducing the AXL ubiquitination mediated by ARRDC3, which may provide a kind of potential therapeutic target and new idea for individualized treatment of RCC.

Key words: ARRDC3; AXL; Signaling pathway; Proliferation; Renal cell carcinoma**Chinese Library Classification(CLC):** R-33; R737.11 **Document code:** A**Article ID:** 1673-6273(2020)13-2401-05

* 基金项目: 国家自然科学基金项目(81372753)

作者简介: 陈暮霖(1992-), 男, 硕士研究生, 主要研究方向: 肾细胞癌, E-mail: cml0613@sina.com

Δ 通讯作者: 凡杰(1966-), 男, 教授, 博士生导师, 主要研究方向: 泌尿系统肿瘤, E-mail: Jief67@sina.com

(收稿日期: 2020-03-05 接受日期: 2020-03-28)

前言

肾细胞癌(Renal cell carcinoma, RCC), 简称肾癌, 发病率占肾脏肿瘤(Kidney cancer)总数的 90 %以上^[1]。AXL 是 TAM (TYRO3-AXL-MER)受体酪氨酸激酶家族的成员之一, 可由生长停滞特异性蛋白 6(Growth arrest-specific protein 6, GAS6)激活并发生磷酸化, 继而增强其下游 PI3K/AKT 等相关细胞通路的活性, 促进肿瘤细胞增殖、侵袭、转移及上皮间充质转化(Epithelial mesenchymal transformation, EMT)和耐药等一系列生物学行为^[2,3]。近年来, 多项研究揭示并肯定了蛋白泛素化过程对肾癌的重要意义^[4-7]。我们前期的研究发现 ARRDC3(α -Arrestin-Domain-Containing 3)在肾癌中表达显著降低, 并且可通过增强泛素化修饰的方式调节 Hippo-YAP1 信号通路, 产生抑癌效应^[8]。有趣的是, 在研究过程中我们发现除 YAP1 之外, ARRDC3 还可能与 AXL 蛋白发生相互作用^[8]。我们推测: 与同 YAP1 作用相似, ARRDC3 可能在肾癌细胞内通过增强 AXL 蛋白的泛素化, 促进 AXL 蛋白降解以发挥下调 AKT 信号通路活性及抑制细胞增殖的作用。本课题旨在利用 Crispr-Cas9 技术建立 ARRDC3 缺陷表达的 786-O 肾透明细胞癌株, 并利用免疫印迹、免疫沉淀等技术, 进一步探究 ARRDC3 对肾透明细胞癌的抗肿瘤作用及机制。

1 材料与方法

1.1 材料

肾透明细胞癌 786-O 细胞系购自中国科学院细胞库; RPMI-1640 培养基购自 Gibco 公司; BCA 试剂盒、蛋白酶磷酸化酶抑制剂购自碧云天公司; 重组人 GAS6 蛋白购自于 R&D system 公司; ARRDC3、GAPDH 抗体购自于 Abcam 公司; AXL、p-AXL、AKT、p-AKT (T308)、p-AKT (S473) 抗体购自于 Cell Signaling Technology 公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 786-O 细胞系使用含 10 %胎牛血清(FBS) RPMI-1640 培养基。细胞放置在 37 °C、5 % CO₂ 细胞恒温培养箱中, 细胞汇合度达 70 %-80 %时进行细胞传代, 每 2-3 天更换一次培养基。

1.2.2 ARRDC3 缺陷型细胞系的构建 选择特异靶向 ARRDC3 基因 4 号外显子的 sgRNA 目的片段装入 Crispr/Cas9 载体, 并进行测序验证。将测序正确的载体与 puromycin 抗性载体一起转染肾癌细胞, 24 h 后进行消化并稀释, 加入 puromycin 筛选 2 天后, 换成正常培养基培养 2 周, 获得单克隆细胞。将获得的单克隆细胞用 ARRDC3 抗体进行免疫印迹分析, 获得完全不表达 ARRDC3 蛋白的单克隆细胞, 保存, 并扩大培养。抽提单克隆细胞的基因组 DNA, 进行目标区域的 PCR 扩增, 将 PCR 产物进行测序, 以便明确碱基插入或缺失的位置及碱基数目。将野生型或突变型 ARRDC3 载体与 puromycin 抗性载体一起转染 ARRDC3 缺陷型肾癌细胞, 24 h 进行消化并稀释, 加入 puromycin 筛选 2 周, 获得单克隆细胞。将获得的单克隆细胞用标签抗体进行免疫印迹分析, 获得稳定回复表达野生型或突变型 ARRDC3 的单克隆细胞, 保存, 并扩大培养。

1.2.3 免疫印迹(Western blotting) 消化并收集待测目的细胞后, 加入细胞裂解液和蛋白酶磷酸化酶抑制剂提取细胞蛋白, 并使用 BCA 试剂盒对样品内蛋白进行定量检测。在蛋白样品中加入上样缓冲液, 颠倒混匀后在 98 °C 煮沸 10 min。电泳/转膜后用 5 %脱脂牛奶-TBST 溶液(检测磷酸化蛋白需使用 5 % BSA-TBST 溶液)封闭 45 min。在 4 °C 摇床孵育一抗过夜。次日用 TBST 溶液洗膜三次, 每次 10 min。室温孵育二抗 1 h, TBST 溶液洗膜五次, 每次 7 min。后加 ECL 化学发光剂显影进行分析。

1.2.4 免疫沉淀(Immunoprecipitation) 向待测目的细胞培养基内加入 MG132 以阻断蛋白降解 (20 μ M), 6 h 后收集细胞。收细胞时加入细胞裂解液收集细胞蛋白。裂解完毕后, 先留取约 30 μ L 作 input, 再向剩余蛋白裂解液中 30 μ L Preprotein A/G agarose beads, 置于 4 °C 转盘上旋转混匀 20 min。然后将样品在 12000 rpm, 4 °C 下离心 10 min, 留取上清液, 弃去沉淀。将预纯化蛋白样品中加入约 30 μ L 的 Flag-beads, 在 4 °C 转盘上缓慢颠倒孵育过夜。次日, 3000 rpm, 4 °C 离心 3 min 后弃上清液, 洗涤 beads 3 次。洗涤完毕后, 再次弃上清, 向沉淀中加入 50 μ L 2 $\times$ 上样缓冲液, 98 °C 金属浴煮沸 10 min。离心后弃去细胞沉淀, 吸取上清留做后续免疫印迹实验或放置在 -80 °C 保存备用。

1.2.5 CCK-8 消化待检测的目的细胞, 得到细胞悬液。用细胞计数法对细胞悬液进行计数, 再在 96 孔细胞培养板内进行接种, 使每孔内约含有 10³ 个细胞, 液体体积控制在 100 μ L。每组细胞设置 3 个复孔。之后连续在每天相同时间点处理并观察 6 天。检测时, 吸出原培养基, 每孔中加入 10 %的 CCK-8 无血清培养基 100 μ L (内含 10 μ L CCK-8 试剂)。同时在不含细胞的孔内加入该培养基, 将其作为空白对照孔。再将细胞培养板放置在 37 °C 5 % CO₂ 培养箱中, 避光孵育时间 2 h。孵育完毕后, 用酶标仪测定其在波长 450 nm 处的吸光度值。综合检测数据进行统计学分析并绘制细胞增殖曲线。

1.2.6 统计学方法 采用 SPSS 19.0 对实验数据进行统计分析, 用平均数 $\pm$ 标准差表示计量资料。两组间比较用独立样本的 Student's t 检验, $P < 0.05$ 认为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 敲除 ARRDC3 增加 AXL 蛋白水平

我们利用 CRISPR-Cas9 技术构建稳定敲除 ARRDC3 的 786-O 细胞株 ARRDC3-KO。首先我们设计针对 ARRDC3 基因第四号外显子(Exon 4)的引导 RNA(sgRNA): 5'-GAGGTACA-GAACCAGCAACA-3'。再将 sgRNA 构建至 pX335-U6-Chimeric_BB-CBh-hSpCas9n 载体中。将成功构建的重组质粒转染 786-O 细胞, 通过单克隆筛选并用免疫印迹验证, 最终获得了 ARRDC3 缺陷型 786-O 细胞株 ARRDC3-KO。DNA 测序结果表明缺陷型细胞株在 ARRDC3 第四号外显子缺失 14 个碱基对, 造成了 ARRDC3 的移码突变(图 1A)。

我们随后扩大培养 ARRDC3 野生型细胞株 ARRDC3-WT 和 ARRDC3 缺陷型细胞株 ARRDC3-KO, 利用免疫印迹方法验证 ARRDC3 的敲除情况和 AXL 蛋白水平。结果显示 ARRDC3-KO 组的 AXL 蛋白水平较 ARRDC3-WT 组显著增高(图 1B)。

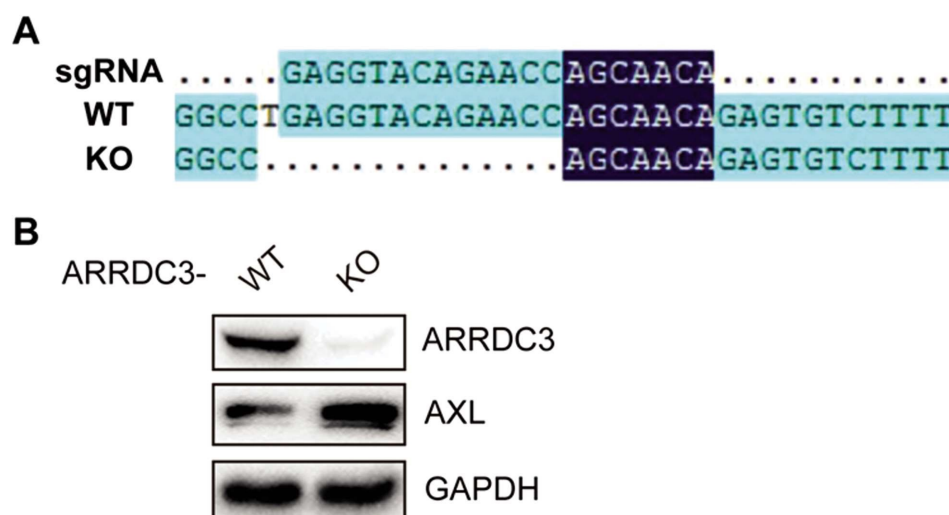


图1 敲除 ARRDC3 增加 AXL 蛋白水平: A. ARRDC3-KO 肾癌细胞系内 ARRDC3 区域基因组 DNA 测序图;

B. ARRDC3-KO 组肾癌细胞的 AXL 蛋白水平显著增加

Fig.1 ARRDC3 deficiency increased AXL protein: A. Sequencing of ARRDC3 gene in ARRDC3-KO cells; B AXL protein significantly increased in ARRDC3-KO cells

2.2 敲除 ARRDC3 降低 AXL 的泛素化水平

在前期关于 ARRDC3 和 YAP1 的研究中, 我们发现 ARRDC3 促进 YAP1 蛋白降解是通过增强 YAP1 的泛素化修饰来实现的。为探讨敲除 ARRDC3 增加 AXL 蛋白水平的机制, 我们在 ARRDC3-WT 和 ARRDC3-KO 细胞株内转染等量的 HA-Ub 和 AXL-Flag 质粒, 通过免疫沉淀法检测两组细胞中 AXL 泛素化水平的差异。实验结果表明, 与 ARRDC3-WT 组相比, ARRDC3-KO 组细胞的 AXL 泛素化水平明显降低 (图 2), 这提示 ARRDC3 通过促进 AXL 泛素化降低 AXL 的蛋白水平。

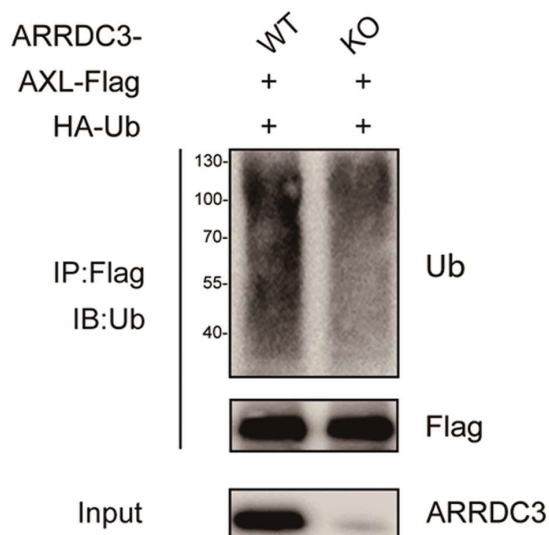


图2 敲除 ARRDC3 降低 AXL 的泛素化水平: 免疫沉淀检测敲除 ARRDC3 对 AXL 泛素化水平的影响

Fig.2 Immunoprecipitation was performed to investigate the effect of ARRDC3 on the ubiquitination of AXL

2.3 敲除 ARRDC3 增强 AXL/AKT 信号通路的磷酸化水平

为了明确 ARRDC3 介导 AXL 泛素化负调节 AXL 蛋白水平的生理意义, 我们对肾癌细胞内 AXL/AKT 信号通路的磷酸化水平进行了检测。在血清饥饿 12 h 后, 我们先使用 GAS6 蛋

白分别处理 ARRDC3-WT 和 ARRDC3-KO 组细胞 (200 ng/mL, 30 min) 以激活 AXL, 再收集细胞并通过免疫印迹的方法分析两组细胞中 AXL 下游信号通路中关键分子 AKT 的磷酸化水平。结果显示, 在 GAS6 蛋白的作用之下, ARRDC3-KO 组细胞的 AXL 自身磷酸化水平、AKT 的磷酸化水平与 ARRDC3-WT 组相比都明显增强 (图 3)。

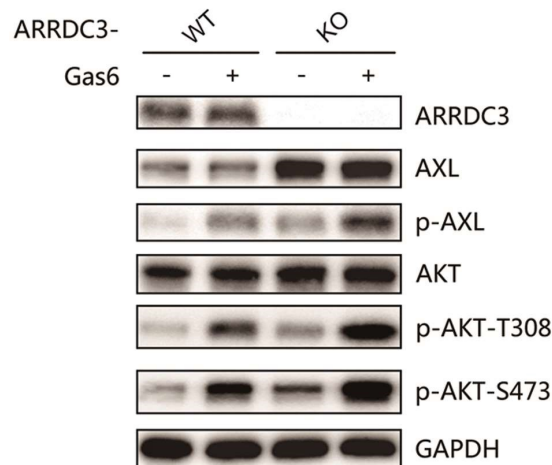


图3 敲除 ARRDC3 增强 AXL/AKT 信号通路的磷酸化水平

Fig.3 ARRDC3 deficiency enhances phosphorylation of the AXL/AKT signaling pathway

2.4 敲减 ARRDC3 缺陷细胞内的 AXL 蛋白恢复 AKT 磷酸化水平

在发现敲除 ARRDC3 可以增强 AXL/AKT 信号通路的活性之后, 我们继续进行进一步的实验以探究产生这一效应的分子机制。在 ARRDC3 缺陷的 ARRDC3-KO 细胞中通过转染 shRNA 的方法降低 AXL 蛋白的表达水平后, 我们观察到 AXL 下游的 AKT 磷酸化恢复到与野生型细胞近似的水平 (图 4)。这一结果表明, 敲除 ARRDC3 导致 AXL/AKT 信号通路磷酸化水平增强依赖于 AXL。

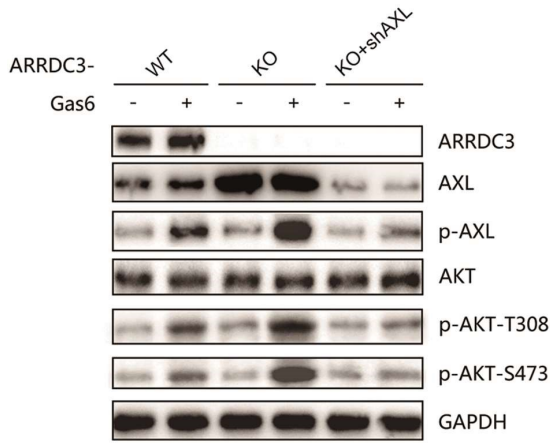


图4 敲减 ARRDC3 缺陷细胞内的 AXL 蛋白恢复 AKT 磷酸化水平
Fig.4 Knocking down of AXL protein in ARRDC3-deficient cells restored the phosphorylation of AKT

2.5 敲除 ARRDC3 促进肾癌细胞增殖依赖 AXL

我们利用 CCK-8 试剂盒检测 ARRDC3-WT、ARRDC3-KO 和 ARRDC3-KO+shAXL 三组细胞在 6 天内的增殖情况, 根据所得的 OD450 nm 数值, 绘制出细胞增殖曲线(图 5)。结果显示, 敲除 ARRDC3 可明显增强 786-O 细胞的增殖, 该差异具有统计学意义 (**, $P<0.001$); 而在敲除 ARRDC3 的基础上再降低 AXL 表达得到的 ARRDC3-KO+shAXL 细胞系中, 其细胞增殖数目略高于与野生型 ARRDC3-WT, 但该差异并无统计学意义 (NS, $P=0.2526$)。

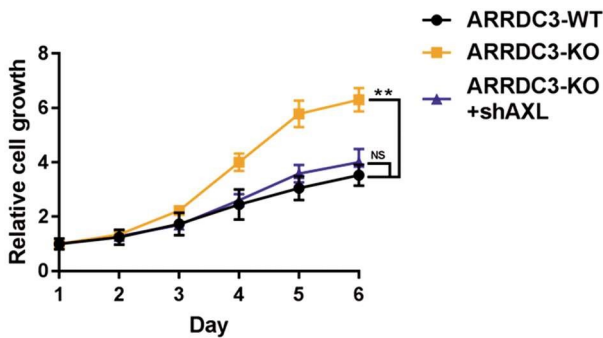


图5 敲除 ARRDC3 促进肾癌细胞增殖依赖 AXL

Fig.5 ARRDC3 deficiency promoted proliferation in 786-O cells, which was dependent on AXL

Note: ** $P<0.001$, compared with ARRDC3-KO group; NS $P=0.2526$, compared with ARRDC3-KO+shAXL.

3 讨论

人体内存在着多种蛋白质的调控系统, 其中泛素-蛋白酶系统 (ubiquitin-proteasome system, UPS) 是调控蛋白质功能和稳定性系统内重要的一员^[9,10]。文献报道, 约超过 80% 的蛋白质系借由 UPS 被细胞降解, 泛素化修饰对蛋白的调节机制在多种肿瘤的病理过程中均发挥着十分重要的作用^[11,12]。

α -Arrestin 蛋白家族是一类介导受体内吞、泛素化降解的接头蛋白, ARRDC3 是其蛋白家族的成员之一^[13,14]。ARRDC3 野生型分子结构包括 Arrestin-N 端、Arrestin-C 端以及 PPXY 模体共三个结构域^[8]。ARRDC3 蛋白可以通过 PPXY 模体结合

并招募含有 WW 结构域的 E3 泛素连接酶, 形成蛋白复合体, 该复合体可对特定的底物进行泛素化修饰, 增加其泛素化水平^[15,16]。研究报道 ARRDC3 在包括乳腺癌、前列腺癌、肾癌在内的多种肿瘤中的表达显著下调^[8,17-19]。ARRDC3 可增强对如 Intergrin 4、PAR1 等蛋白的泛素化修饰, 并参与到这些蛋白的降解过程之中^[15,20]。Soung YH 等人近期的研究发现, 除抑制肿瘤增殖、侵袭、转移以外, ARRDC3 还与 miR-200b 之间存在正反馈回路, 这一机制在逆转肿瘤上皮间充质转化和 DNA 损伤剂的化疗耐药方面也发挥了关键的作用^[21]。

AXL 是一种单跨膜的受体酪氨酸激酶, 其分子结构共包括细胞外区域(包括两个免疫球蛋白区域和两个与纤维连接蛋白同源的重叠区域)、跨膜区域和细胞内激酶区域(包括 3 个磷酸化位点 Y779、Y821 和 Y866)共三部分^[22]。生长停滞特异性蛋白 6(GAS6)可通过自分泌或者旁分泌的方式, 与 AXL 胞外区域结合激活 AXL 发生磷酸化, 并继续激动下游信号通路, 产生一系列促肿瘤发生发展的效应^[23-25]。PI3K/AKT 是 AXL 下游的重要信号通路之一, 经 AXL 的作用后 PI3K 被激活, 产生的磷酸化磷脂酰肌醇产物协同蛋白激酶活化 AKT, 并进一步影响下游因子的活化状态, 对细胞增殖产生重要的影响^[26,27]。除此之外, 在耐靶向药物治疗的肿瘤细胞中, AXL 信号通路的旁路激活效应被认为是耐药形成的重要分子机制^[28,29]。由此可见, 深入研究调控 AXL 细胞通路的机制具有十分重大的意义。

本研究首先利用 Crispr-Cas9 技术构建并通过测序和免疫印迹的方法成功鉴定出 ARRDC3 缺陷表达的 ARRDC3-KO 细胞系。然后分析 ARRDC3-KO 肾癌细胞内的 AXL 蛋白, 发现 ARRDC3 与 AXL 的蛋白水平呈负相关关系。结合既往的文献和研究结果, 我们预测 ARRDC3 可能在肾癌细胞内发挥促 AXL 泛素化降解的功能。之后我们又进行免疫沉淀实验明确了敲除 ARRDC3 引起 AXL 泛素化水平降低的生物学效应。这些实验结果提示, ARRDC3 可通过促进肾癌内 AXL 蛋白的泛素化修饰负向调节 AXL 的蛋白水平。之后进行的检测 AKT 信号通路的磷酸化水平和细胞增殖状况的实验结果相对应, 提示敲除 ARRDC3 不仅可以导致肾癌细胞内 AXL/PI3K/AKT 信号通路的异常持续激活, 还同时促进了肾癌细胞的增殖, 并且这两种效应依赖于 AXL 蛋白。然而, 本研究未深入系统地探讨 ARRDC3 和 AXL 的详细作用机制及 ARRDC3 负调节 AXL 蛋白水平对于肾癌靶向药物耐药、迁徙、EMT 等其它方面的影响。这些工作也是我们下一步实验研究的主要内容。

综上所述, 在 786-O 细胞内敲除 ARRDC3 通过降低 ARRDC3 对 AXL 的泛素化降解, 上调 AXL 蛋白水平和 AXL/PI3K/AKT 信号通路的活性, 并促进肾癌细胞的增殖。这一机制的发现可为肾癌个体化治疗提供可行的潜在靶点和新思路。

参考文献(References)

- [1] Hsieh J J, Purdue M P, Signoretti S, et al. Renal cell carcinoma[J]. Nat Rev Dis Primers, 2017, 3: 17009
- [2] Myers S H, Brunton V G, Unciti-Broceta A. AXL Inhibitors in Cancer: A Medicinal Chemistry Perspective [J]. J Med Chem, 2016, 59(8): 3593-3608
- [3] Burstyn-Cohen T, Maimon A. TAM receptors, Phosphatidylserine, in-

- flammation, and Cancer[J]. Cell Commun Signal, 2019, 17(1): 156
- [4] Roe J S, Kim H R, Hwang I Y, et al. von Hippel-Lindau protein promotes Skp2 destabilization on DNA damage [J]. Oncogene, 2011, 30(28): 3127-3138
- [5] Yu S, Dai J, Ma M, et al. RBCK1 promotes p53 degradation via ubiquitination in renal cell carcinoma[J]. Cell Death Dis, 2019, 10(4): 254
- [6] Kang H M, Noh K H, Chang T K, et al. Ubiquitination of MAP1LC3B by pVHL is associated with autophagy and cell death in renal cell carcinoma[J]. Cell Death Dis, 2019, 10(4): 279
- [7] Huang X Q, Hao S, Zhou Z Q, et al. The Roles of Ubiquitination Factor E4B (UBE4B) in the Postoperative Prognosis of Patients with Renal Cell Carcinoma and in Renal Tumor Cells Growth and Metastasis [J]. Onco Targets Ther, 2020, 13: 185-197
- [8] Xiao J, Shi Q, Li W, et al. ARRDC1 and ARRDC3 act as tumor suppressors in renal cell carcinoma by facilitating YAP1 degradation[J]. Am J Cancer Res, 2018, 8(1): 132-143
- [9] Kocaturk N M, Gozuacik D. Crosstalk Between Mammalian Autophagy and the Ubiquitin-Proteasome System[J]. Front Cell Dev Biol, 2018, 6: 128
- [10] Li X, Elmira E, Rohondia S, et al. A patent review of the ubiquitin ligase system: 2015-2018 [J]. Expert Opin Ther Pat, 2018, 28(12): 919-937
- [11] Ao N, Chen Q, Liu G. The Small Molecules Targeting Ubiquitin-Proteasome System for Cancer Therapy [J]. Comb Chem High Throughput Screen, 2017, 20(5): 403-413
- [12] Kwon Y T, Ciechanover A. The Ubiquitin Code in the Ubiquitin-Proteasome System and Autophagy [J]. Trends Biochem Sci, 2017, 42(11): 873-886
- [13] Patwari P, Lee R T. An expanded family of arrestins regulate metabolism[J]. Trends Endocrinol Metab, 2012, 23(5): 216-222
- [14] Does M R, Trejo J. Endo-lysosomal sorting of G-protein-coupled receptors by ubiquitin: Diverse pathways for G-protein-coupled receptor destruction and beyond[J]. Traffic, 2019, 20(2): 101-109
- [15] Nabhan J F, Pan H, Lu Q. Arrestin domain-containing protein 3 recruits the NEDD4 E3 ligase to mediate ubiquitination of the beta2-adrenergic receptor[J]. E MBO Rep, 2010, 11(8): 605-611
- [16] Soung Y H, Ford S, Yan C, et al. The Role of Arrestin Domain-Containing 3 in Regulating Endocytic Recycling and Extracellular Vesicle Sorting of Integrin beta4 in Breast Cancer[J]. Cancers (Basel), 2018, 10(12)
- [17] Yao J, Xu C, Fang Z, et al. Androgen receptor regulated microRNA miR-182-5p promotes prostate cancer progression by targeting the ARRDC3/ITGB4 pathway[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2016, 474(1): 213-219
- [18] Zheng Y, Lin Z Y, Xie J J, et al. ARRDC3 Inhibits the Progression of Human Prostate Cancer Through ARRDC3-ITGbeta4 Pathway [J]. Curr Mol Med, 2017, 17(3): 221-229
- [19] Shen X, Sun X, Sun B, et al. ARRDC3 suppresses colorectal cancer progression through destabilizing the oncoprotein YAP[J]. FEBS Lett, 2018, 592(4): 599-609
- [20] Arakaki A, Pan W A, Lin H, et al. The alpha-arrestin ARRDC3 suppresses breast carcinoma invasion by regulating G protein-coupled receptor lysosomal sorting and signaling[J]. J Biol Chem, 2018, 293(9): 3350-3362
- [21] Soung Y H, Chung H, Yan C, et al. Arrestin Domain Containing 3 Reverses Epithelial to Mesenchymal Transition and Chemo-Resistance of TNBC Cells by Up-Regulating Expression of miR-200b [J]. Cells, 2019, 8(7): 692-705
- [22] Graham D K, DeRyckere D, Davies K D, et al. The TAM family: phosphatidylserine sensing receptor tyrosine kinases gone awry in cancer[J]. Nat Rev Cancer, 2014, 14(12): 769-785
- [23] Myers S H, Brunton V G, Unciti-Broceta A. AXL Inhibitors in Cancer: A Medicinal Chemistry Perspective[J]. J Med Chem, 2016, 59(8): 3593-3608
- [24] Alonso-Gordoa T, Garcia-Bermejo M L, Grande E, et al. Targeting Tyrosine kinases in Renal Cell Carcinoma: "New Bullets against Old Guys"[J]. Int J Mol Sci, 2019, 20(8)
- [25] Li M, Ye J, Zhao G, et al. Gas6 attenuates lipopolysaccharide-induced TNFalpha expression and apoptosis in H9C2 cells through NFkappaB and MAPK inhibition via the Axl/PI3K/Akt pathway [J]. Int J Mol Med, 2019, 44(3): 982-994
- [26] Gay C M, Balaji K, Byers L A. Giving AXL the axe: targeting AXL in human malignancy[J]. Br J Cancer, 2017, 116(4): 415-423
- [27] Wu G, Ma Z, Cheng Y, et al. Targeting Gas6/TAM in cancer cells and tumor microenvironment[J]. Mol Cancer, 2018, 17(1): 20
- [28] Zhou L, Liu X D, Sun M, et al. Targeting MET and AXL overcomes resistance to sunitinib therapy in renal cell carcinoma [J]. Oncogene, 2016, 35(21): 2687-2697
- [29] Singla N. Progress Toward Precision Medicine in Frontline Treatment of Metastatic Renal Cell Carcinoma[J]. JAMA Oncology, 2020, 6(1): 25-26