

# 体内外成熟卵丘复合体中卵丘细胞蛋白质组学差异的研究

彭丽英, 朱文杰, 付志红\*, 李雪梅, 陈秀敏, 周永红

(南方医科大学附属深圳市妇幼保健院, 深圳 518048)

**【摘要】** 目的 比较体内外成熟卵丘复合体的卵丘细胞蛋白质组学差异,探讨体外成熟卵母细胞发育能力差的原因,进一步阐明卵母细胞发育调控机制。方法 收集 20 例因男性因素行卵胞浆内单精子注射-胚胎移植(ICSI-ET)的患者成熟卵丘复合体的卵丘细胞为对照组,该 20 例患者的不成熟卵丘复合体经体外培养成熟后的卵丘细胞为实验组,将两组卵丘细胞进行双向凝胶电泳分析,并通过质谱技术鉴定差异蛋白质。结果 实验组与对照组相比共有 13 个蛋白质表达上调(其中 7 个蛋白质的表达水平,实验组是对照组的 3 倍以上;6 个蛋白质在实验组有表达,而在对照组中无表达),10 个蛋白质表达下调(其中 2 个蛋白质的表达水平,对照组是实验组的 3 倍以上;8 个蛋白质在实验组无表达,而在对照组中有表达),筛选质谱鉴定了 6 个蛋白点,得到 5 种蛋白质包括 PRO2044 蛋白、KIAA1191 蛋白、乙酰辅酶 A 酰基转移酶 2、II 型角蛋白亚基蛋白和 ARID2 蛋白。结论 通过蛋白质组学研究技术发现卵丘复合体在体内成熟与体外成熟存在差异,这些差异蛋白质主要与清除自由基、抗凋亡、细胞周期调控等相关,推测这些蛋白质的表达异常可能与体外成熟卵母细胞质量差的原因有关。

**【关键词】** 卵丘细胞; 蛋白质组学; 卵母细胞体外成熟

## Differential proteomics research about cumulus cells of cumulus-oocyte complexes during in vivo and in vitro maturation

PENG Li-ying, ZHU Wen-jie, FU Zhi-hong\*, LI Xue-mei, CHEN Xiu-min, ZHOU Yong-hong

Department of Reproductive Medicine, Southern medical university Affiliated Shenzhen Maternity and Child Health Care Hospital, Shenzhen 518048

### 【Abstract】

**Objective:** To explore causes of poor developmental competence of oocyte in vitro maturation through analyzing difference in protein expression in cumulus cells of cumulus-oocyte complexes(COCs) during in vivo and in vitro maturation.

**Methods:** The cumulus cells of mature COCs in vivo were obtained from 20 patients after oocyte collection during ICSI-ET, as a control group. The cumulus cells of immature COCs were collected from these 20 patients and cultured in vitro maturation, as experiment group. The differences of protein expression in cumulus cells from both groups were analyzed by two dimensional polyacrylamide gel electrophoresis and MALDI-TOF-TOF mass spectrograph.

**Results:** Thirteen proteins were up-regulated in the experimental group compared with the control group. Among them, the expression of 7 proteins in the experimental group was 3 times higher than the control group; 6 proteins were expressed in the experimental group and had no expression in the control group. Ten proteins were down-regulated. Among them the expression of 2 proteins in the experimental group was 3 times higher than the control group. Eight proteins were expressed in the control group and

**【收稿日期】** 2013-09-10; **【修回日期】** 2013-09-27

**【基金项目】** 深圳市科技计划项目(2010020282)

**【作者简介】** 彭丽英,女,江西鹰潭人,硕士生,生殖医学专业.( \* 通讯作者)

had no expression in the experimental group. Five proteins were identified by MALDI-TOF-MS, which were PRO2044 protein, KIAA1191 protein, acetyl-Coenzyme A acyltransferase 2, type II keratin subunit protein and ARID2 protein.

**Conclusions:** The differences of COCs during in vivo and in vitro maturation are identified through proteomics techniques. The differential expression proteins are related with scavenging free radicals, anti-apoptosis, cell cycle regulation. Therefore, it is speculated that the differential expression of these proteins may be the causes of poor quality of oocyte in vitro maturation.

**Key words:** Cumulus cells; Proteomics; Oocytes; In vitro maturation

(*J Reprod Med* 2014,23(1):1-6)

目前体外受精-胚胎移植(IVF-ET)周期成熟卵母细胞的获得主要有两种方式即体内成熟和体外成熟(in vitro maturation,IVM)。卵母细胞 IVM 技术避免促排卵诱发的卵巢过度刺激综合征(OHSS),减少促排卵药物的应用,与 IVF 联合应用,还可增加可移植胚胎和冷冻胚胎的数量,增加累积妊娠率,提高患者助孕成功率。但人类 IVM 仍存在诸多问题:卵母细胞的 IVM 成熟率不高、成熟后卵母细胞的 IVF 率和卵裂率较低、胚胎移植后妊娠率低<sup>[1,2]</sup>。其关键因素是卵母细胞质量差,胚胎发育不良。目前研究<sup>[3]</sup>发现体外培养卵母细胞核成熟几乎不受影响,其胞质成熟不完全可能是其发育能力下降的重要原因。

卵泡发育过程中,卵母细胞与卵丘细胞通过缝隙连接和旁分泌方式形成一个很重要的双向调节轴,卵母细胞起主导作用,调控颗粒细胞的分化和功能,反过来后者又调控卵母细胞生长环境,影响卵母细胞的发育<sup>[4]</sup>。卵丘细胞在卵母细胞成熟特别是胞质成熟过程中起重要作用,体外培养中,卵母细胞与卵丘细胞之间信息传递减弱以及细胞生长环境改变引起的应激反应,可能导致卵丘细胞功能改变,进而影响卵母细胞发育<sup>[5,6]</sup>。卵丘细胞功能的研究可能是探讨卵母细胞 IVM 的一条新思路。目前对于 IVM 卵丘细胞的研究主要集中于一些特定蛋白,未能从整体上系统地分析卵丘细胞的蛋白质群及其作用。因此,本实验通过研究体外与体内成熟卵丘复合体(cumulus-oocyte complexes, COCs)中卵丘细胞的蛋白质表达的差异,寻找与卵母细胞 IVM 相关的重要蛋白质群,探讨卵母细胞 IVM 发育能力差的原因,进一步阐明卵母细胞发育机制。

### 材料与方法

#### 一、研究对象

选择 2012 年 4 月至 10 月在我院生殖中心因单

纯男性因素行卵胞浆内单精子注射-胚胎移植(ICSI-ET)治疗的患者 20 例,年龄 26~37 岁,平均 33.3 岁。

#### 二、卵丘细胞的收集与保存

20 例患者常规长方案,3 个以上卵泡平均直径达到 16 mm,注射人绒毛膜促性腺激素(HCG),34~36 h 内取卵。取卵后,在体视显微镜下将卵冠丘复合体分级:卵冠丘复合体大而松散,放射冠界限清楚者为 COCs;卵冠丘复合体小而致密,放射冠紧包绕在透明带周围者为不成熟 COCs。

1. 体内成熟卵丘细胞的收集:将成熟的 COCs 孵育 4h,ICSI 之前,用巴士德吸管(Sigma,美国)吹散 COCs 周围的卵丘细胞,拆除卵丘细胞后的卵母细胞在倒置显微镜下观察其成熟度,收集成熟卵母细胞周围的卵丘细胞,标为对照组。

2. IVM 卵丘细胞的收集:将不成熟 COCs 置于添加了 75 IU/L 人绝经期促性腺激素(HMG)的成熟培养液(Vitrolife,美国)中,于 37℃、5% CO<sub>2</sub>、饱和湿度培养箱中培养,24 h 后用注射针剥除卵丘细胞,观察卵母细胞是否排出第一极体,收集排出第一极体卵母细胞周围的卵丘细胞,标为实验组。将收集到的卵丘细胞离心、PBS 洗涤、-80℃冻存待用。

#### 三、主要试剂和仪器

1. 主要试剂:固相 pH 梯度干胶条(pH3~10, 18 cm 非线性)、尿素(GibcoBRL,美国)、CHAPS(Calbiochem,德国);乙二胺四乙酸(EDTA)、PMSF、考马斯亮蓝染料 G<sub>250</sub>(Amesco,美国);二硫素糖醇(DTT)、碘乙酰胺(IAM)等(Promega,美国);丙烯酰胺、十二烷基硫酸钠(SDS)、三氟乙酸(TFA)等(Sigma,美国);乙醇、乙酸、甲酸(北京化工厂);多肽标准品和基质 α-氨基-4-羟基肉桂酸(CCA,BrukerAXS,德国)。

2. 主要仪器和软件:UMAX Powerlook

2100XL-USB 扫描仪(力晶科技有限公司);Tanon 电泳槽(上海天能科技有限公司);DYY-7C 型电泳仪(北京六一仪器厂);离心机(Eppendorf, 德国)。基质辅助激光解析电离飞行时间质谱(MALDI-TOF-MS, Bruker, 德国)。胶图分析软件: ImageMaster 2D platinum 5.0(SIB, 瑞士);数据采集软件:flexAnalysis 3.3(Bruker Daltonik, 德国);数据搜索软件:Mascot(Matrixscience, 英国)。

四、蛋白质提取及定量

从-80℃冻存中取出卵丘细胞,用 PBS 悬浮洗涤 3 次,离心后加入蛋白质提取裂解液轻轻振荡,冰浴超声 5min,低温离心(20,000 r/min, 15℃, 30 min)后取上清,蛋白质定量使用 Bradford 法<sup>[7]</sup>测定。

五、双向凝胶电泳

参考 Bio-Rad 双向电泳(2-DE)指南进行,每块凝胶上样量 200 μg。使用 18 cmIPG 胶条进行第一向等电聚焦,聚焦结束后,进行第二向凝胶电泳。每种细胞蛋白样品重复 3 板胶。等电聚焦参数见表 1。电泳所得 2-DE 胶进行银染法染色。染色后的 2-DE 胶用图像扫描仪获取胶图,利用 ImageMaster 2D platinum 5.0 软件对凝胶图像进行分析,统计 3 次重复实验的 2-DE 图谱(实验组和对照组各 3 次),得到符合统计学标准的蛋白质差异点。当一种蛋白质在两组样品之间量变倍数 ≥ 3 倍时认为这个蛋白在二者之间有显著性差异。

表 1 等电聚焦参数

步骤	电压/V	模式	时间	作用
水化	—	—	12h(17℃)	被动水化
S1	250	慢速	25 min	除盐
S2	1,000	快速	2 h	除盐
S3	8,000	线性	5 h	升压
S4	8,000	快速	6 h	聚焦
S5	500	快速	任意时间	保持

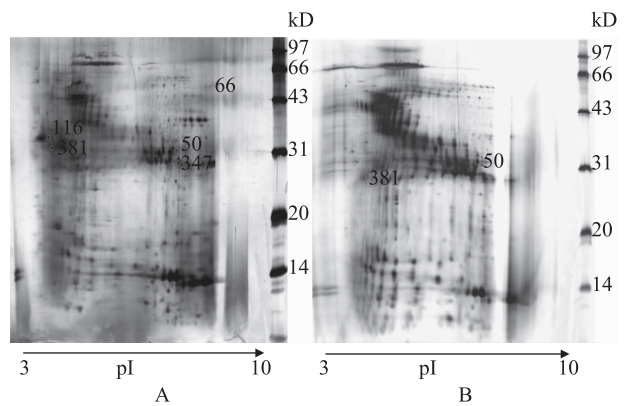
六、质谱鉴定

切下差异蛋白质点, MALDI-TOF-MS 质谱仪进行各蛋白质点的质谱检测,得到的数据经 flex-Analysis 3.3 分析软件生成肽质量指纹图谱(peptide mass fingerprinting, PMF),其分析数据和 MS-MS 数据结合,将结合数据集提交到 Mascot(蛋白数据库检索程序)进行蛋白鉴定,搜索 NCBI 数据库,得到具体蛋白质。

结 果

一、双向电泳结果

本次室验经 ImageMaster 2D platinum 5.0 软件分析所得到的双向凝胶电泳图(图 1),共找到 23 个差异蛋白质点,实验组与对照组相比,13 个蛋白质表达上调(其中 7 个蛋白质的表达水平,实验组是对照组的 3 倍以上;6 个蛋白质在实验组有表达,在对照组中无表达),10 个蛋白质表达下调(其中 2 个蛋白质的表达水平,对照组是实验组的 3 倍以上;8 个蛋白质在实验组无表达,在对照组中有表达)。



A 为体内成熟卵丘细胞组(对照组), B 为 IVM 卵丘细胞组(实验组)

图 1 卵丘细胞的双向凝胶电泳图谱

二、差异蛋白质质谱鉴定结果

根据蛋白质的分子量、等电点及差异倍数 ≥ 3 倍等综合条件,选择 10 个差异蛋白点,经酶解等过程,进行 MALDI-TOF-MS 分析,得到蛋白质点的肽质量指纹图(部分见图 2)。PMF 通过 Mascot 查询软件及搜索 NCBI 数据库,其中 Mascot 得分示意图(部分见图 3);X 轴为 Mascot 得分,Y 轴为匹配的个数,得分超出阴影区表示差异有统计学意义(P < 0.05)。

在这些蛋白点中,有 6 个差异表达蛋白点得分超出阴影区,得分均 ≥ 66 分(P < 0.05),其中蛋白点 50、425 为同一种蛋白,即共鉴定出 5 种蛋白质。在实验组上调的有:PRO2044 蛋白;实验组下调的有:KIAA1191 蛋白、乙酰辅酶 A 酰基转移酶 2(线粒体 3-oxoacyl-辅酶 α 硫解酶)、II 型角蛋白亚基蛋白和 ARID2 蛋白,其中乙酰辅酶 A 酰基转移酶 2、II 型角蛋白亚基蛋白和 ARID2 蛋白呈现“全或无”的改变,仅在对照组有表达,而在实验组中没有表达。鉴定后数据库搜索结果见表 2。

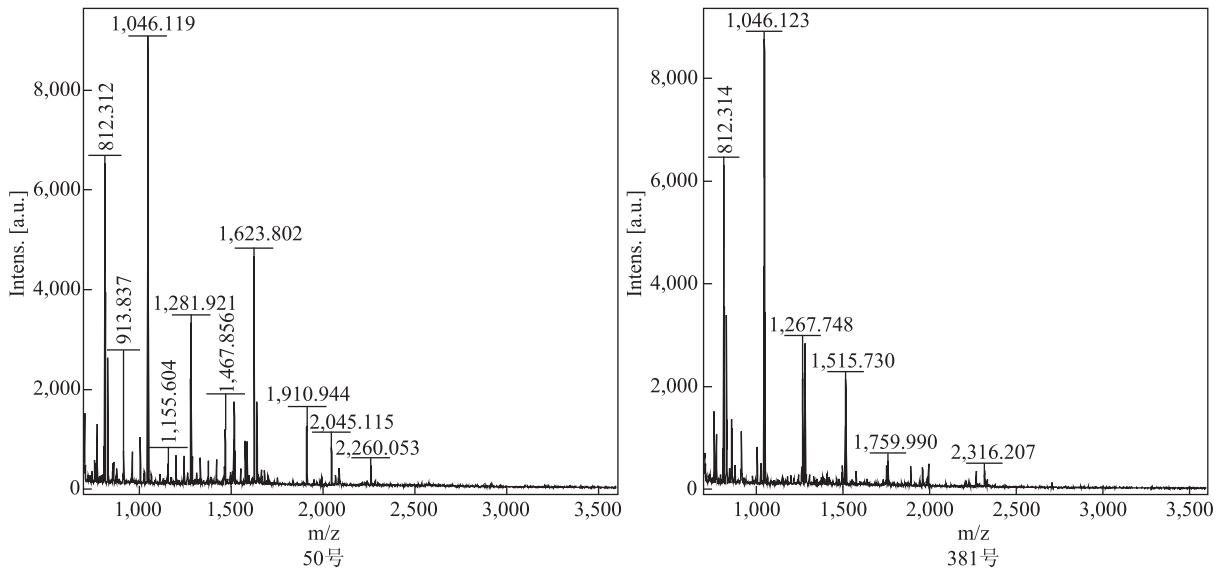


图 2 50 号和 381 号蛋白质点肽质量指纹图谱

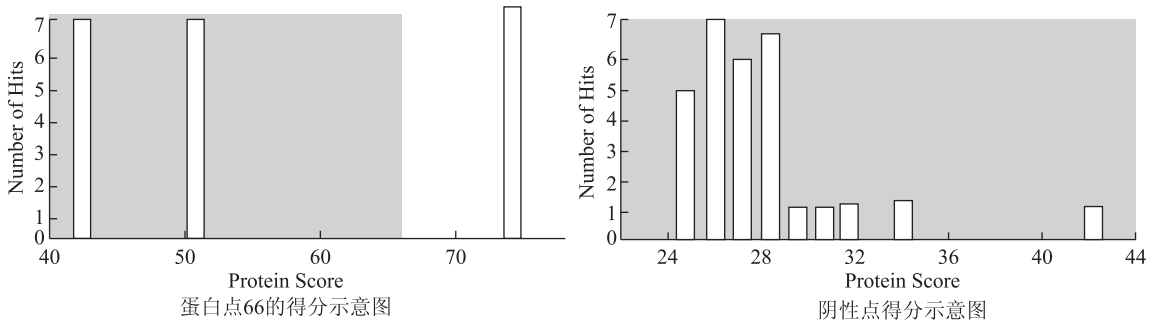


图 3 Mascot 得分示意图

表 2 MALDI-TOF-MS 鉴定的 5 种差异蛋白质信息

蛋白点编号	蛋白质名称	Gi 号	等电点 (pI)	分子量 (D)	得分/匹配数	表达水平
50	PRO2044 蛋白	6650826	6.97	30,084	70/8	↑
66	乙酰辅酶 A 酰基转移酶 2	11953358	8.97	150,619	74/7	↓
116	II 型角蛋白亚基蛋白	386854	5.31	52,928	66/5	↓
347	ARID2 蛋白	71051948	9.41	23,227	67/5	↓
381	KIAA1191 异构体 C	119605496	9.91	9,772	70/6	↓
425	PRO2044 蛋白	6650826	6.97	30,084	74/6	↑

### 讨 论

卵母细胞 IVM 是指将未成熟卵泡的卵母细胞在体外培养,形成次级卵母细胞(MII),能够正常发育,完成受精和着床<sup>[8]</sup>。IVM 主要包括完整的卵泡培养<sup>[9]</sup>和单纯的卵丘复合体培养。通常的 IVM 技术是不经超促排卵或少量应用促性腺激素,注射 HCG 后从卵巢中获取 6~12 mm 未成熟卵,经适宜的体外条件培养,使卵母细胞成熟并具备受精能

力<sup>[10-12]</sup>。本实验中,未成熟卵母细胞来源于常规 IVF 中取卵日直径在 6~12 mm 的小卵泡。此方法采用了经典的 IVF 并结合 IVM 技术,其优点在于因促排卵中卵泡不同步发育,近 15%~20% 小卵泡可不被丢弃,增加了 IVF 周期可利用胚胎数,提高累积妊娠率。

未成熟卵泡体外培养与体内相比:卵子质量差、成熟率低、胚胎发育不良。受伦理方面限制,对人卵母细胞 IVM 的直接研究比较困难,基于卵丘细胞与

卵母细胞之间的紧密联系,本实验通过研究卵丘细胞功能探讨卵母细胞体外培养过程环境变化导致其发育不良的原因。既往针对卵丘细胞的研究主要集中在于个别蛋白或基因,而从整体上系统地分析体外培养 COCs 中卵丘细胞功能改变的报道甚少。目前新兴的蛋白质组学方法可为其在蛋白水平的改变提供技术上的支持。本研究采用高分辨率的蛋白质分离手段电泳 2-DE,结合高通量的蛋白质鉴定质谱技术,全面研究在特定情况下蛋白质表达谱,分析体内外成熟 COCs 中卵丘细胞蛋白质的差异表达,得到 6 个差异蛋白点,经质谱鉴定得到 5 种蛋白质的明确信息(其中两个蛋白点为同一种蛋白质):PRO2044 蛋白、KIAA1191 蛋白、乙酰辅酶 A 酰基转移酶 2、II 型角蛋白亚基蛋白和 ARID2 蛋白。主要与细胞应激、抗凋亡、细胞周期调控作用相关。

根据 NCBI 数据库鉴定分析结果,PRO2044 蛋白可能是血清白蛋白的 C-末端片段。生理状态下,血清白蛋白在体内具有有效的抗氧化能力。血清白蛋白氨基酸序列的 34 位存在一自由的半胱氨酸残基,是血管内还原性巯基的主要来源。这些巯基,是活性氧和氮的清除剂,尤其是对超氧化物、巯基离子及过氧化亚硝酸盐。本研究结果中 PRO2044 蛋白在实验组表达上调,推断是否在 COCs 的 IVM 过程中,外界的刺激使 PRO2044 蛋白表达增高、血清白蛋白活性增强以消除自由基、抗氧化从而体外 COCs 能发育成熟。目前尚未见 PRO2044 蛋白具体功能的相关报道。李黎等<sup>[13]</sup> 研究人成熟卵泡液蛋白质谱图,鉴定出 PRO2044 蛋白;Shishkin 等<sup>[14]</sup> 研究前列腺癌的蛋白质组学时也鉴定出 PRO2044 蛋白。但是,均未分析其功能和作用。KIAA1191 蛋白是一种含 305 个氨基酸的蛋白质,存在三种亚型(异构体 A、B、C),属于 UPF0498 家族。亦未见其与卵丘细胞及卵泡发育方面的相关报道,该蛋白在本研究实验组表达是下调的,其在卵母细胞发育机制中究竟起着怎样的作用还需要进一步研究和探索。

乙酰辅酶 A 酰基转移酶 2(acetyl coenzyme A acyltransferase 2,ACAA2) 又称线粒体 3-羧基辅酶 A 硫解酶(mitochondrial 3-oxoacyl-coenzyme A thiolase),分布在线粒体,为酰基转移酶,参与脂肪酸代谢。ACAA2 在脂肪酸代谢中起着重要的作用<sup>[15]</sup>。Cao 等<sup>[16]</sup> 通过构建分裂泛素膜酵母双杂交系统,使用促凋亡线粒体蛋白 BNIP3 作为诱饵,发现 ACAA2 能

清除 BNIP3 诱导的凋亡。BNIP3 和 ACAA2 共存于线粒体内,BNIP3 是一种 Bcl-2 家族促凋亡蛋白,BNIP3 过度表达可致凋亡且能压制抗凋亡基因活性<sup>[17]</sup>,它也参与细胞自我吞噬作用<sup>[18]</sup>。Ju 等<sup>[19]</sup> 在研究人肝线粒体蛋白质组的主导蛋白时也发现了 ACAA2 蛋白,表明 ACAA2 在脂肪酸代谢、调节线粒体细胞信号转导、细胞凋亡信号等细胞功能上有重要作用。对 COCs 体内外的研究都显示,在卵母细胞的正常成熟过程中,存在卵丘细胞凋亡现象,卵丘细胞凋亡率影响卵母细胞和随后胚胎的发育潜能<sup>[20]</sup>。此外,COCs 的成熟、发育需要线粒体中脂肪酸代谢产生 ATP 提供能量。因此我们认为本实验中,ACAA2 在实验组表达下调,在对照组即体内成熟的 COCs 中表达明显增高,可能说明 ACAA2 通过以上机制在体内卵丘复合体中出现高表达是导致卵丘复合体在体内较体外培养成熟率高的原因之一。

角蛋白主要分为两型:I 型和 II 型,是上皮细胞的一种中间丝蛋白。两型上皮角蛋白在上皮细胞是以特异的“配对”共同表达的<sup>[21]</sup>。角蛋白以高度特定的模式表达,在上皮细胞相关的组织和阶段细胞分化过程中呈现出高度特定模式,是上皮细胞的骨架成分,其主要功能是保护细胞免受机械和非机械性损伤及与维持细胞和细胞器的形态及完整性有关,此外,一些角蛋白还有调节功能,参与细胞内的信号转导通路,如保护应激,促进伤口愈合和抵抗细胞凋亡<sup>[22]</sup>。本研究显示,II 型角蛋白仅在对照组中有表达,推测 COCs 在 IVM 过程中卵丘细胞的调节功能、保护应激及细胞内信号转导通路抗凋亡等作用相对减弱,以致 COCs 体外培养中发育能力较差,但是需要进一步的实验证实。

本研究还显示,仅在对照组中表达的还有 ARID2 蛋白。人类 ARID2 蛋白由一个保守的 N-末端 ARID 结构域、RFX-型的翼形螺旋,富含脯氨酸和谷氨酰胺区及两个保守的 C-末端 C2H2 锌指基序组成<sup>[23]</sup>。ARID2 是 ARID 蛋白家族的第二个亚家族,有报道 ARID 蛋白参与多种生物学效应包括胚胎发育、细胞系基因调控、细胞周期调控等<sup>[24]</sup>。Diederichs 等<sup>[25]</sup> 研究发现,ARID2 是细胞周期蛋白 A1-CDK2 复合体的新型协调蛋白,但其具体机制尚不清楚。卵丘复合体的发育成熟与细胞因子、细胞周期蛋白的作用密不可分,卵丘细胞的增殖和卵母细胞的减数分裂必须有细胞因子的参与及紧密调控,结合本实验中 ARID2 在体内成熟组表达水平

的升高,不难推测 COCs 在体外培养时基因调控能力较体内成熟要相对弱些,其是否是卵母细胞 IVM 发育差的另一原因,这一推论我们将在下一步研究中加以验证。

本研究成功利用 2-DE 电泳和质谱分析等蛋白质组学技术,发现卵丘复合体在体内成熟与 IVM 存在差异,主要与清除自由基、抗凋亡、细胞周期调控功能相关,为我们下一步应用逆转录聚合酶链式反应(RT-PCR)和 Western blot 探讨这些候选基因与卵母细胞及胚胎发育之间的关系研究提供了良好的基础。另外,这些蛋白可作为卵母细胞 IVM 发育能力差的潜在的标志蛋白,为我们进一步探索卵母细胞 IVM 的发育机制提供了重要的线索。

【参 考 文 献】

[1] 巫新春,曹云霞. 人体外与体内成熟卵母细胞发育潜能及妊娠结局的观察[J]. 生殖医学杂志,2006,15:361-365.

[2] Albus FK, Sasseville M, Lane M, et al. Simulated physiological oocyte maturation (SPOM): a novel in vitro maturation system that substantially improves embryo yield and pregnancy outcomes [J]. Human Reprod, 2010, 25: 2999-3011.

[3] Viaris de Lesegno C, Reynaud K, Pechoux C, et al. Ultrastructural evaluation of in vitro-matured canine oocytes[J]. Reprod Fertil Dev, 2008, 20: 626-639.

[4] Gilchrist RB, Lane M, Thompson JG. Oocyte-secreted factors: regulators of cumulus cell function and oocyte quality [J]. Hum Reprod Update, 2008, 14: 159-177.

[5] Hasegawa A, Kumamoto K, Mochida N, et al. Gene expression profile during ovarian folliculogenesis[J]. J Reprod Immunol, 2009, 1877: 5-9.

[6] Tesfaye D, Ghanem N, Carter F, et al. Gene expression profile of cumulus cells derived from cumulus-oocyte complexes matured either in vivo or in vitro [J]. Reprod Fertil Dev, 2009, 21: 451-461.

[7] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding[J]. Anal Biochem, 1976, 72: 248-254.

[8] 洪焱,黄绘,骆荣,等. 培养液中添加不同促性腺激素对卵母细胞体外成熟的影响[J]. 生殖与避孕, 2011, 31: 833-836.

[9] Newton H, Illingworth P. In-vitro growth of murine pre-antral follicles after isolation from cryopreserved ovarian tissue[J]. Hum Reprod, 2001, 16: 423-429.

[10] Gremeau AS, Andreadis N, Fatum M, et al. In vitro maturation or in vitro fertilization for women with polycystic ovaries? A case-control study of 194 treatment cycles [J]. Fertil Steril, 2012, 98: 355-360.

[11] Son WY, Chung JT, Herrero B, et al. Selection of the optimal day for oocyte retrieval based on the diameter of the dominant follicle in hCG-primed in vitro maturation cycles [J]. Hum Reprod, 2008, 23: 2680-2685.

[12] Smits JE, Thompson JG, Gilchrist RB, et al. The promise of in vitro maturation in assisted reproduction and fertility preservation [J]. Semin Reprod Med, 2011, 29: 24-37.

[13] 李黎,邢福祺,陈士岭,等. 人成熟卵泡液蛋白质谱图的初步研究[J]. 现代妇产科进展, 2007, 16: 453-456.

[14] Shishkin SS, Kovalyov LI, Kovalyova MA, et al. "Prostate Cancer Proteomics" Database [J]. Acta Nature, 2010, 2: 95-104.

[15] Wanders RJ, Vreken P, Ferdinandusse S, et al. Peroxisomal fatty acid alpha-and beta-oxidation in humans: enzymology, peroxisomal metabolite transporters and peroxisomal diseases [J]. Biochem Soc Trans, 2001, 29: 250-267.

[16] Cao W, Liu N S, Tang S, et al. Acetyl-Coenzyme A acyltransferase 2 attenuates the apoptotic effects of BNIP3 in two human cell lines [J]. Biochim biophys Acta, 2008, 1780: 873-880.

[17] Yasuda M, Han J, Dionne CA, et al. BNIP3a: a human homolog of mitochondrial proapoptotic protein BNIP3 [J]. Cancer Res, 1999, 59: 533-537.

[18] Kanzawa T, Zhang L, Xiao L, et al. Arsenic trioxide induces autophagic cell death in malignant glioma cells by upregulation of mitochondrial cell death protein BNIP3 [J]. Oncogene, 2005, 24: 980-991.

[19] Ju YF, Yang JJ, Liu R, et al. Antigenically dominant proteins within the human liver mitochondrial proteome identified by monoclonal antibodies [J]. Sci China Life Sci, 2011, 54: 16-24.

[20] Hist E, Gabrielsen A, Lindenberg S, et al. Apoptosis in human cumulus cells in relation to zona pellucida thickness variation, maturation stage, and cleavage of the corresponding oocyte after intracytoplasmic sperm injection [J]. Fertil Steril, 2002, 77: 511-515.

[21] Rajan B, Lokesh J, Kiron V, et al. Differentially expressed proteins in the skin mucus of Atlantic cod (*Gadus morhua*) upon natural infection with *Vibrio anguillarum* [J]. BMC Vet Res, 2013, 9: 103.

[22] Moll R, Divo R, Langbein L. The human keratins: biology and pathology [J]. Histochem Cell Biol, 2008, 129: 705-733.

[23] Zhao H, Wang J, Han Y, et al. ARID2: a new tumor suppressor gene in hepatocellular carcinoma [J]. Oncotarget, 2011, 2: 886-891.

[24] Wilsker D, Patsialou A, Dallas PB, et al. ARID proteins: a diverse family of DNA binding proteins implicated in the control of cell growth, differentiation, and development [J]. Cell Growth Differ, 2002, 13: 95-106.

[25] S Diederichs, N. Baumer, P. Ji, et al. Identification of interaction partners and substrates of the cyclin A1-CDK2 complex [J]. J Biol Chem, 2004, 279: 33727-33741.