

CTSB 在肝内胆管细胞癌中表达及对癌细胞增殖及 NF- κ B 信号通路的影响

张利, 姚俊芳, 张磊, 褚菲菲, 吴慧丽

(郑州大学附属郑州中心医院, 河南 郑州 450007)

摘要: [目的] 探讨人组织蛋白酶 B (CTSB) 在肝内胆管细胞癌中表达及对癌细胞增殖及核因子- κ B (NF- κ B) 信号通路的影响。[方法] 采用 Western blot 检测肝内胆管细胞癌中 CTSB 蛋白表达, 使用 siRNA 对 CTSB 沉默后采用 Edu 实验检测细胞增殖, 同时检测 NF- κ B 信号通路中相应蛋白表达情况。[结果] 与正常肝细胞系相比, 肝内胆管细胞癌 RBE、HCCC9810、HUCCT1 中 CTSB 蛋白表达水平均明显提高 ($t=7.724, 8.839, 7.983, P=0.002, 0.001, 0.002$)。与 Control 组相比, CTSB-siRNA 组的 CTSB 蛋白表达量明显下降 ($t=6.131, P=0.004$), 细胞增殖比例明显下降 ($t=5.271, P=0.006$), 且 CTSB-siRNA 组的 NF- κ B 抑制蛋白 α (I κ B- α)、I κ B 激酶 β (IKK- β)、IKK α 和 p-NF- κ B 蛋白水平明显下降 ($t=6.069, 5.433, 6.365, 5.717, P=0.004, 0.006, 0.003, 0.005$)。[结论] 肝内胆管细胞癌中 CTSB 蛋白表达水平明显上调, 且 CTSB 能够通过活化 NF- κ B 信号通路促进肿瘤细胞增殖。

主题词: 人组织蛋白酶 B; 肝内胆管细胞癌; 核因子- κ B 信号通路; 细胞增殖

中图分类号: R735.7 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-170X(2020)10-0886-05

doi: 10.11735/j.issn.1671-170X.2020.10.B007

Expression of CTSB in Intrahepatic Cholangiocarcinoma and Its Effect on Proliferation of Cancer Cells and NF- κ B Signaling Pathway

ZHANG Li, YAO Jun-fang, ZHANG Lei, CHU Fei-fei, WU Hui-li

(Zhengzhou Central Hospital Affiliated to Zhengzhou University, Zhengzhou 450007, China)

Abstract: [Objective] To investigate the expression of CTSB in intrahepatic cholangiocarcinoma and its effect on the proliferation of cancer cells and the NF- κ B signaling pathway. [Methods] The expression of CTSB protein in intrahepatic bile duct cancer cells was detected by Western blot. After silencing CTSB with siRNA, cell proliferation was detected by Edu assay and corresponding protein expression in NF- κ B signaling pathway was detected. [Results] Compared with normal liver cell lines, the expression level of CTSB protein in intrahepatic bile duct cancer cells (RBE, HCCC9810 and HUCCT1) was significantly increased ($t=7.724, 8.839$ and $7.983, P=0.002, 0.001$ and 0.002 , respectively). Compared with the control group, the expression of CTSB protein in the CTSB-siRNA group decreased significantly ($t=6.131, P=0.004$). Compared with the Control group, cell proliferation in the CTSB-siRNA group was significantly decreased ($t=5.271, P=0.006$). Compared with the control group, the expression levels of IKK β , IKK α , p-IK β and p-NF- κ B proteins in the CTSB-siRNA group decreased significantly ($t=6.069, 5.433, 6.365$ and $5.717, P=0.004, 0.006, 0.003$ and 0.005 , respectively). [Conclusion] The expression level of CTSB protein in intrahepatic cholangiocarcinoma is significantly up-regulated, and CTSB can promote the proliferation of tumor cells by activating NF- κ B signaling pathway.

Subject words: cathepsin B; intrahepatic cholangiocarcinoma; nuclear factor κ B signaling pathway; cell proliferation

肝内胆管细胞癌是消化系统常见的恶性肿瘤,

基金项目: 河南省医学科技攻关计划项目 (2018020772)

通信作者: 张利, 副主任医师, 硕士; 郑州大学附属郑州中心医院消化内科, 河南省郑州市中原区桐柏路 16 号 (450007); E-mail: baker818@126.com

收稿日期: 2019-11-22; **修回日期:** 2020-02-20

在肝脏原发性肿瘤中占 15% 左右, 其发病率和死亡率近年来逐步上升^[1]。肝内胆管细胞癌的早期症状不明显, 患者一经诊断已经处于肝内胆管细胞癌晚期, 错失最佳治疗时机^[2]。因此肝内胆管细胞癌的发

病机制是目前肿瘤研究的热点之一,对其发病机制进行深入探讨,从中筛选出与肝内胆管细胞癌发病密切相关的肿瘤标志物分子,并将其应用于肝内胆管细胞癌的 diagnosis 和治疗具有重要的临床价值^[3]。人组织蛋白酶 B (Cathepsin B, CTSB) 属于半胱氨酸蛋白酶家族,能够催化细胞内蛋白发生水解^[4]。在乳腺癌和肺癌中 CTSB 高表达,与肿瘤细胞增殖和迁移密切相关^[5-6]。核因子- κ B (nuclear factor κ B, NF- κ B) 信号通路参与细胞对外界刺激的应答,在免疫反应和炎症反应过程中发挥重要作用^[7]。在结肠癌和肝癌中 NF- κ B 信号通路异常活化,与肿瘤细胞增殖和耐药密切相关^[8-9]。本研究对肝内胆管癌细胞中 CTSB 表达情况进行检测,以此探讨 CTSB 在肝内胆管细胞癌中表达及其对癌细胞增殖的影响,并对其在肝内胆管细胞癌中的作用机制进行初步探讨。

1 材料与方法

1.1 材料

人正常肝细胞系 L02 以及肝内胆管癌细胞 RBE、HCCC9810 和 HUCCT1 均购自美国 ATCC 细胞库。I κ B 激酶 β (inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase β , IKK- β) (ab124957)、IKK α (ab32041)、NF- κ B 抑制蛋白 α (inhibitor of NF- κ B- α , I κ B- α) (ab75746)、IKB α (ab32518) 和 p-NF- κ B (ab222494) 抗体均购自美国 Abcam 科技有限公司。二喹啉甲酸 (Bicinchoninic acid disodium, BCA) 蛋白定量试剂盒 (货号 P0009, 规格: 5000 次) 购自碧云天生物科技有限公司。凝胶成像分析仪 (型号: GenoSens 2000 Touch) 购自上海勤翔科学仪器有限公司。5-乙炔基-2'-脱氧尿嘧啶核苷 (5-ethynyl-2'-deoxyuridine, Edu) 细胞增殖检测试剂盒 (货号: CA1170, 规格: 100T) 购自北京索莱宝科技有限公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养

采用 DMEM 高糖培养基对 L02、RBE、HCCC9810 和 HUCCT1 细胞进行培养, DMEM 高糖培养基中添加 5% 胎牛血清以及 1% 双抗, 培养条件为 37℃, 5% CO₂。L02 细胞按 1:2 进行传代, RBE、HCCC9810 和 HUCCT1 细胞按 1:3 比例进行传代。

1.2.2 Western blot 检测蛋白表达

取 $8 \times 10^5 \sim 1 \times 10^6$ 个细胞于离心管中, 1000rpm 离

心 5min 后于沉淀中加入 100 μ l 细胞裂解液及 1 μ l 蛋白酶抑制剂, 4℃裂解 20min。采用 BCA 蛋白定量试剂盒对裂解液中蛋白质浓度进行检测, 根据裂解液的蛋白浓度取出 10 μ g 蛋白于另一离心管中, 加入细胞裂解液定容至 50 μ l, 加入 10 μ l 的 6 $\times$ 十二烷基磺酸钠 (Sodium Dodecyl Sulfonate, SDS) 后震荡混匀, 于 98℃加热变性 10min。蛋白样品制备完成后取 40 μ l 进行 10% 的 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (polyacrylamide gel electrophoresis, PAGE) 凝胶电泳, 并将蛋白转膜至聚偏二氟乙烯 (polyvinylidene fluoride, PVDF) 膜上。转膜完成后将 PVDF 膜取出并浸没于 5% 脱脂牛奶中封闭, 封闭结束后使用 TBST 缓冲液冲洗 PVDF 膜 3 次, 10min/次。根据蛋白大小将 PVDF 膜裁剪成对应条带, 在蛋白所在条带中滴加对应蛋白的一抗, 于 4℃孵育 12h 以上。使用 TBST 缓冲液冲洗 PVDF 膜 3 次, 10min/次。按 1:2000 比例稀释二抗, 稀释液为 3% 脱脂牛奶, 并滴加于膜上, 室温孵育 30min。使用 TBST 缓冲液冲洗 PVDF 膜 3 次, 10min/次。滴加化学发光 (chemiluminescence, ECL) 显色液将膜覆盖, 室温孵育 1min 于凝胶成像分析仪中拍照。

1.2.3 细胞分组和转染

按 1×10^6 个细胞/孔将 HCCC9810 细胞铺种于 6 孔板中, 细胞分为 Control 组、NC-siRNA 组和 CTSB-siRNA 组, 每组设置 3 个复孔, 铺种细胞 16h 进行细胞转染, 分别加入转染试剂、转染试剂+NC-siRNA 和转染试剂+CTSB-siRNA。转染后 72h 进行蛋白和细胞增殖检测。

1.2.4 Edu 实验

采用 Edu 细胞增殖检测试剂盒检测细胞增殖, 将 HCCC9810 细胞按 5000 个/孔铺种于 90 孔板中, 转染 48h 后将培养基吸出, 加入含 50 μ mol/L Edu 的完全培养基, 培养箱中孵育 30min 后取出并加培养基吸出, 加入 5% 多聚甲醛固定细胞 40min, PBS 缓冲液冲洗 3 次, 0.5% 的 TritonX-100 透化处理 30min, PBS 缓冲液冲洗 3 次。加入抗 Edu 工作液并于暗盒中室温下孵育 30min 对增殖细胞进行染色, PBS 缓冲液冲洗 3 次, 加入 200 μ l 的 Hoechst 染料并于暗盒中室温孵育 30min 对细胞核进行染色, 荧光倒置显微镜下观察并拍照, 每组重复 3 孔, 记录每孔中 Edu 阳性细胞数 (呈绿色) 和 Hoechst 阳性细胞

数(呈蓝色), 细胞增殖比例=Edu 阳性细胞数/Hoechst 阳性细胞数 $\times 100\%$ (处于增殖期细胞数/总细胞数 $\times 100\%$)。

1.3 统计学处理

采用 SPSS20.0 软件对数据进行分析。计量资料采用平均值 $\pm$ 标准差表示, 采用 t 检验, 多组间比较采用方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 肝内胆管癌细胞中 CTSB 表达

以正常肝细胞系 L02 作为对照, 对肝内胆管癌细胞 RBE、HCCC9810 和 HUCCT1 的 CTSB 蛋白表达进行检测。肝内胆管癌细胞 RBE、HCCC9810 和 HUCCT1 中 CTSB 蛋白表达均明显高于正常肝细胞系, 差异均有统计学意义($t=7.724, 8.839, 7.983, P=0.002, 0.001, 0.002$)(Figure 1)。在 RBE、HCCC9810 和 HUCCT1 细胞中, HCCC9810 细胞中 CTSB 蛋白表达差异更为显著, 因此后续实验选择 HCCC9810 细胞进行实验。

2.2 siRNA 转染效果验证

采用 NC-siRNA 和 CTSB-siRNA 转染 HCCC9810 细胞, 转染 48h 后采用 Western blot 检测细胞中 CTSB 蛋白表达量。CTSB-siRNA 组 CTSB 蛋白表达量明显低于 Control 组和 NC-siRNA 组, 组间差异有统计学意义($t=6.131, 6.107, P=0.004, 0.004$), 而 NC-siRNA 组和 Control 组的 CTSB 蛋白表达量差异无统计学意义($t=0.093, P=0.930$)。转染后细胞中 CTSB 蛋白表达量见图 2(Figure 2)。

2.3 转染 CTSB-siRNA 对 HCCC9810 细胞增殖的影响

CTSB-siRNA 组细胞增殖比例明显低于 Control 组和 NC-siRNA 组, 组间差异有统计学意义($t=5.271, 5.107, P=0.006, 0.007$)。而 NC-siRNA 组和 Control 组的细胞增殖比例差异无统计学意义

($t=0.069, P=0.948$)(Figure 3)。

2.4 转染 CTSB-siRNA 对 HCCC9810 细胞 NF- κ B 信号通路的影响

CTSB-siRNA 组 IKK β 、IKK α 、p-IK β 和 p-NF- κ B 蛋白水平明显低于 Control 组, 组间差异有统计学意义($t=6.069, 5.433, 6.365, 5.717, P=0.004, 0.006, 0.003, 0.005$), 而两组的 IK β 蛋白表达水平差异无

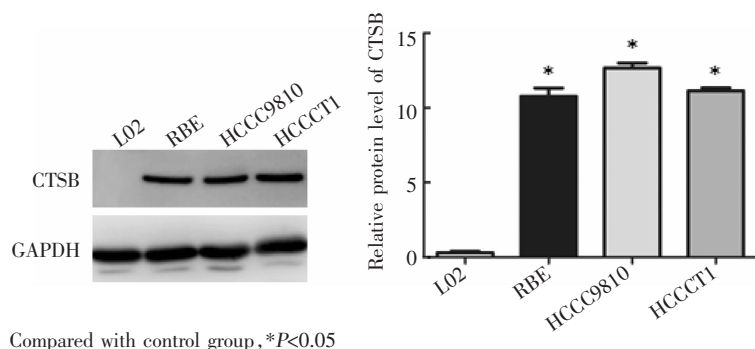


Figure 1 CTSB expression in intrahepatic cholangiocarcinoma cells

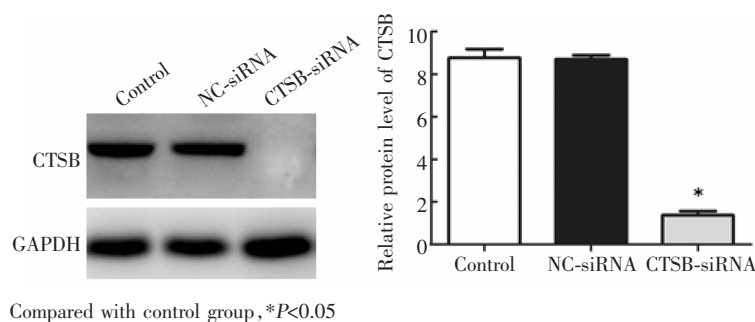


Figure 2 CTSB expression after CTSB siRNA transfected in HCCC9810 cells

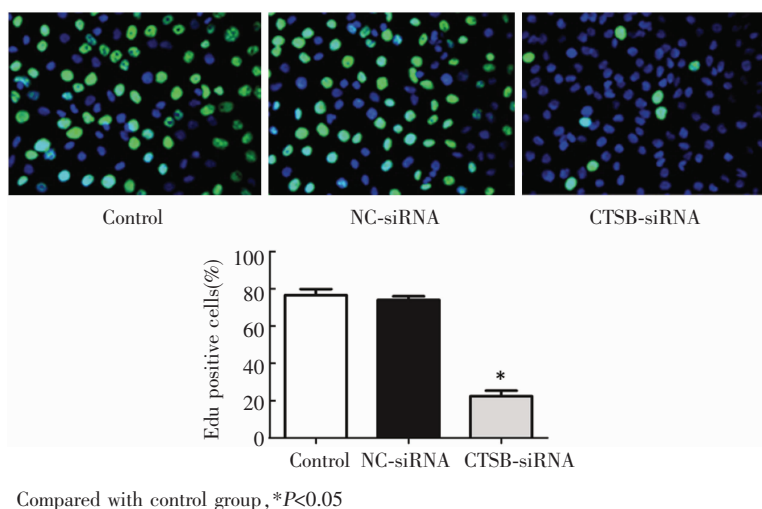


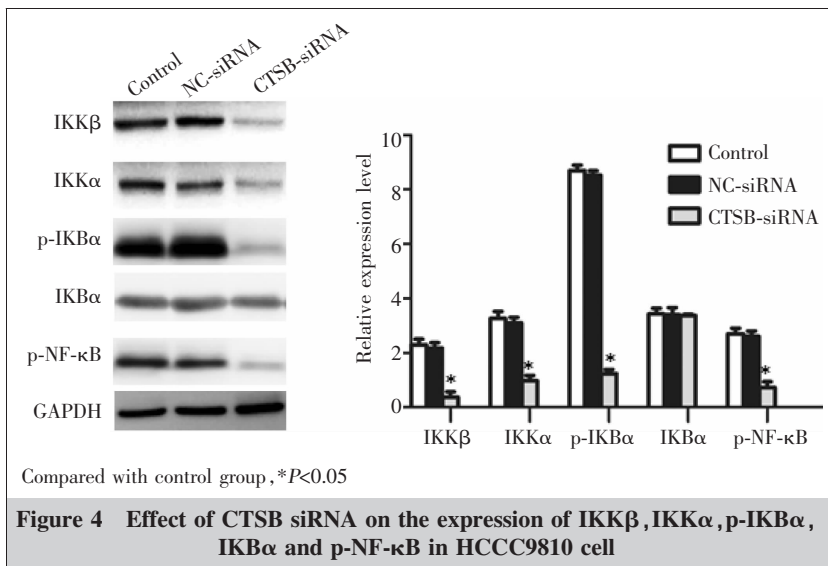
Figure 3 Effects of CTSB expression on proliferation of HCCC9810 cells

统计学意义($t=0.144, P=0.893$)。NC-siRNA 组和 Control 组的 IKK β 、IKK α 、p-IKB α 、IKB α 和 p-NF- κ B 蛋白表达水平差异均无统计学意义 ($t=0.147, 0.200, 0.297, 0.154, 0.249, P=0.890, 0.851, 0.781, 0.855$ 和 0.815)(Figure 4)。

3 讨论

肝内胆管细胞癌的死亡率逐年上升, 且其发病率在肝脏恶性肿瘤中仅次于肝细胞肝癌, 严重影响患者的生命健康^[10]。对肝内胆管细胞癌发病机制进行深入探究对于肝内胆管细胞癌治疗和诊断靶点的挖掘显得尤为必要。

CTSB 主要分布于溶酶体当中, 参与蛋白质的溶酶体降解过程^[11], 在食管癌等肿瘤中高表达, 且与食管癌患者不良预后相关^[12]。本研究发现肝内胆管癌细胞中 CTSB 蛋白表达量明显上调, 并且采用 siRNA 沉默 CTSB 表达后肝内胆管癌细胞增殖受到明显抑制。李磊等^[13]发现在胃癌中细胞凋亡水平升高使得肿瘤细胞中胱天蛋白酶-3 (caspase-3) 和 Caspase-9 蛋白表达激活, 活化的 Caspase-3 和 Caspase-9 蛋白能够破坏溶酶体, 导致 CTSB 蛋白从溶酶体中释放并被降解, 最终胃癌细胞死亡, 在胃癌中 CTSB 表达与 Caspase-3 和 Caspase-9 蛋白表达呈负相关。Bian 等^[14]发现在直肠癌中 CTSB 高表达, 并且沉默 CTSB 表达后直肠癌细胞增殖能力明显下降, 同时细胞周期抑制蛋白 27 (cell cycle inhibitor protein 27, p27) 和细胞周期蛋白 B1 (cyclinB1) 等细胞周期抑制蛋白的表达水平明显升高。Bai 等^[15]发现在氧化应激过程中, 氧自由基能够上调 CTSB 的蛋白酶活性, 促进 CTSB 对 Caspase-1 蛋白的切割, 从而激活 Caspase-1 蛋白, 活化的 Caspase-1 蛋白进一步促进细胞分泌白介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β), 导致炎症反应的发生。因此在肝内胆管细胞癌中 CTSB 表达上调一方面会抑制 Caspase-3 和 Caspase-9 等蛋白的活化, 导致肿瘤细胞的凋亡抑制, 从而促进肿瘤细胞增殖。同时 CTSB 促进 Caspase-1 蛋白的活化使得机体的炎症反应水平升高, 使得 IL-1 β 等炎症因子水平升高, IL-1 β 等炎症因子作用于肿瘤细胞有利于



肿瘤细胞的增殖。另一方面, CTSB 表达升高会抑制 p27 和 cyclinB1 等细胞周期抑制蛋白的表达, 从而抑制细胞周期阻滞的发生, 细胞周期的正常运行能促进肿瘤细胞增殖^[16]。

本研究进一步发现 CTSB 沉默后 IKK β 、IKK α 、p-IKB α 和 p-NF- κ B 蛋白水平明显下降, 实验结果表明 CTSB 沉默会抑制 NF- κ B 信号通路的活化。Zhang 等^[17]发现直肠癌中 NF- κ B 信号通路活化能够促进肿瘤细胞增殖, 并且 CyclinD1 等周期促进蛋白是 NF- κ B 信号通路的下游靶点。易蓓等^[18]发现在骨髓瘤中 NF- κ B 抑制剂二硫代氨基甲酸吡咯烷 (pyrrolidine dithiocarbamate, PDTCTC) 会上调 Caspase-3 和 Caspase-8 蛋白的活化, 导致肿瘤细胞凋亡水平升高, 从而抑制肿瘤细胞增殖。Moles 等^[19]发现在肝癌中 p65 蛋白的苏氨酸 505 是其磷酸化位点, 苏氨酸 505 突变会导致 p65 磷酸化水平下降, 进而抑制 p65 入核, 导致 NF- κ B 信号通路的抑制。NF- κ B 信号通路的活化能够明显促进肝癌细胞增殖, 苏氨酸 505 突变能够明显抑制肝癌细胞增殖。因此在肝内胆管细胞癌中 NF- κ B 信号通路活化能够上调 CyclinD1 等周期促进蛋白的表达, 进而促进肿瘤细胞周期进程而促进肿瘤细胞增殖。另一方面, NF- κ B 信号通路活化会抑制 Caspase-3 和 Caspase-8 蛋白的活化, 从而抑制肿瘤细胞凋亡, 从而促进肿瘤细胞增殖。CTSB 沉默后 p-IKB α 和 p-NF- κ B 蛋白水平下降表明 CTSB 对 NF- κ B 信号通路的影响可能是通过抑制 IKB α 和 NF- κ B 蛋白的磷酸化来完成的, IKB α 蛋白

的磷酸化能够加速 IKB α 蛋白的泛素化降解,从而解除 IKB α 蛋白对 NF- κ B 蛋白的抑制作用。NF- κ B 蛋白磷酸化促进 NF- κ B 蛋白的入核,进而结合到一系列肿瘤相关基因的启动子上并上调或下调相应基因转录,以此调节肿瘤细胞的增殖和细胞周期^[20]。

综上所述,在肝内胆管细胞癌中 CTSB 蛋白表达水平明显上调,并且 CTSB 能够通过活化 NF- κ B 信号通路促进肿瘤细胞增殖,CTSB 能够作为肝内胆管细胞癌的潜在治疗和诊断靶点,在肝内胆管细胞癌的诊断和治疗中具有一定临床意义。

参考文献:

- [1] Wang K, Shen F. Progress in diagnosis and treatment of intrahepatic cholangiocarcinoma[J]. Journal of Hepatobiliary Surgery, 2019, 27(1): 1-6. [王葵, 沈锋. 肝内胆管癌的诊治进展[J]. 肝胆外科杂志, 2019, 27(1): 1-6.]
- [2] Wang Q, Zhou HB, Hu HP. Modern knowledge and development trend of intrahepatic cholangiocellular carcinoma[J]. Chinese Journal of Hepatology, 2017, 25(5): 336-338. [王庆, 周华邦, 胡和平. 肝内胆管细胞癌的现代认识与发展[J]. 中华肝脏病杂志, 2017, 25(5): 336-338.]
- [3] Oliveira IS, Kilcoyne, Everett JM, et al. Cholangiocarcinoma: classification, diagnosis, staging, imaging features, and management[J]. Abdom Radiol, 2017, 42(6): 1637-1649.
- [4] Li YY, Fang J, Ao GZ. Cathepsin B and L inhibitors: a patent review (2010-present)[J]. Expert Opin Ther Pat, 2017, 27(6): 643-656.
- [5] Yang KM, Bae E, Ahn SG, et al. Co-chaperone BAG2 determines the pro-oncogenic role of cathepsin B in triple-negative breast cancer cells [J]. Cell Rep, 2017, 21(10): 2952-2964.
- [6] Lao ZY, Wu DP, Wang ZY, et al. Cathepsin B promotes cell proliferation and migration of human lung carcinoma cell A549 through ERK pathway[J]. Chinese Clinical Oncology, 2019, 24(5): 391-395. [劳志云, 吴东平, 王智勇, 等. Cathepsin B 通过 ERK 信号通路促进人肺癌细胞 A549 增殖和迁移 [J]. 临床肿瘤学杂志, 2019, 24(5): 391-395.]
- [7] Sun SC. The non-canonical NF- κ B pathway in immunity and inflammation[J]. Nat Rev Immunol, 2017, 17(9): 545-558.
- [8] Zhu YQ, Wang H, Shi XY, et al. miR-31 promotes the proliferation of colorectal cancer cells through activating NF- κ B signal pathway[J]. Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology, 2017, 35(9): 961-969. [朱玥莹, 王皓, 石雪迎, 等. miR-31 通过激活 NF- κ B 信号通路而促进结肠癌细胞增殖 [J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2017, 35(9): 961-969.]
- [9] Qiu Y, Dai Y, Zhang C, et al. Arsenic trioxide reverses the chemoresistance in hepatocellular carcinoma: a targeted intervention of 14-3-3 η /NF- κ B feedback loop [J]. J Exp Clin Cancer Res, 2018, 37(1): 321.
- [10] Khan AS, Dageforde LA. Cholangiocarcinoma[J]. Surg Clin North Am, 2019, 99(2): 315-335.
- [11] Liu F, Li X, Lu C, et al. Ceramide activates lysosomal cathepsin B and cathepsin D to attenuate autophagy and induces ER stress to suppress myeloid-derived suppressor cells[J]. Oncotarget, 2016, 7(51): 83907-83925.
- [12] He LL, Gao CD, Wen B. Expression and significance of cathepsin B and cystatin C in esophageal cancer [J]. Guangdong Medical Journal, 2017, 38(9): 1402-1405. [何琳莉, 高驰丹, 文彬. cathepsin B 与 cystatin C 在食管癌中的表达及意义[J]. 广东医学, 2017, 38(9): 1402-1405.]
- [13] Li L, Zhao LM, Cui WX, et al. Periplocin extracted from cortex periplocae(CPP) induced apoptosis of gastric cancer cells MGC-803 through lysosomal pathway[J]. Cancer Research on Prevention and Treatment, 2016, 43 (5): 21-25. [李磊, 赵连梅, 崔雯萱, 等. 香加皮杠柳苷通过溶酶体途径诱导胃癌 MGC-803 细胞凋亡 [J]. 肿瘤防治研究, 2016, 43(5): 21-25.]
- [14] Bian B, Sébastien Mongrain, Sébastien Cagnol, et al. Cathepsin B promotes colorectal tumorigenesis, cell invasion, and metastasis[J]. Mol Carcinog, 2016, 55(5): 671-687.
- [15] Bai H, Yang B, Yu W, et al. Cathepsin B links oxidative stress to the activation of NLRP3 inflammasome [J]. Exp Cell Res, 2018, 362(1): 180-187.
- [16] Schmitz J, Gilberg E, Löser R. Cathepsin B: active site mapping with peptidic substrates and inhibitors[J]. Bioorg Med Chem, 2019, 27(1): 1-15.
- [17] Zhang W, Lu Y, Li X, et al. CDCA3 promotes cell proliferation by activating the NF- κ B/cyclin D1 signaling pathway in colorectal cancer [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2018, 500(2): 196-203.
- [18] Yi B, Yuan HD, Xu YH, et al. Effect of NF- κ B inhibitor pyrrolidine dithiocarbamate on proliferation and apoptosis of human multiple myeloma U266 cells [J]. Chinese Journal of Pathophysiology, 2017, 33(7): 1177-1183. [易蓓, 袁海汀, 许永会, 等. NF- κ B 抑制剂 PDTC 对人骨髓瘤 U266 细胞增殖和凋亡的影响[J]. 中国病理生理杂志, 2017, 33(7): 1177-1183.]
- [19] Moles A, Butterworth JA, Sanchez A, et al. A RelA (p65) Thr505 phospho-site mutation reveals an important mechanism regulating NF- κ B-dependent liver regeneration and cancer[J]. Oncogene, 2016, 35(35): 4623-4632.
- [20] Cildir G, Low KC, Tergaonkar V. Noncanonical NF- κ B signaling in health and disease[J]. Trends Mol Med, 2016, 22(5): 414-429.