

• 综述 •

DOI: 10.13865/j.cnki.cjbmb.2018.04.05

管家基因 GAPDH 在肿瘤与衰老组织中作为内参应慎重

郑琳^{1),2),3)}, 郑慧玲^{1),2),3)}, 刘新光^{1),2),3)}*

⁽¹⁾ 广东医科大学衰老研究所, 东莞 523808; ⁽²⁾ 广东省医学分子诊断重点实验室, 广东医科大学, 东莞 523808;

⁽³⁾ 广东医科大学生物化学与分子生物学研究所, 东莞 523808)

摘要 甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)是糖酵解过程中的一个酶,编码该酶的基因为管家基因,几乎在所有组织中呈高水平、恒定表达,常用作蛋白质、RNA、DNA 等分子生物学相关实验的标准化内参。但近年来,GAPDH 作为内参受到质疑,特别是在肿瘤组织、衰老组织。大量研究证实,GAPDH 在多种肿瘤中表达上调,衰老的骨骼肌中下调。其中 GAPDH 在肿瘤中的高表达可能与肿瘤的侵袭性转移和细胞增殖相关。本文就 GAPDH 在肿瘤、衰老组织或细胞中的表达情况以及可能机制作一综述,旨在更全面地了解管家基因 GAPDH 在肿瘤与衰老组织、细胞中是否恒定表达,以便在研究中可以选择最优的内参做参照。

关键词 甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH); 肿瘤; 衰老

中图分类号 Q591.8

GAPDH Should Be Cautiously Used as an Internal Reference in Tumor and Aging Tissues

ZHENG Lin^{1),2),3)}, ZHENG Hui-Ling^{1),2),3)}, LIU Xin-Guang^{1),2),3)}*

⁽¹⁾ Institute of Aging Research, Guangdong Medical University, Dongguan 523808, Guangdong, China; ⁽²⁾ Guangdong Provincial Key Laboratory of Medical Molecular Diagnostics, Guangdong Medical University, Dongguan 523808, Guangdong, China;

⁽³⁾ Institute of Biochemistry & Molecular Biology, Guangdong Medical University, Dongguan 523808, Guangdong, China)

Abstract Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) is a house-keeping glycolysis gene highly and constantly expressed in almost every tissue. So it is widely used as a relative reference to quantitate proteins, RNA and DNA. But in recent years, GAPDH has been questioned as an internal reference, especially in tumor and aging tissues. Extensive studies have indicated that GAPDH is up-regulated in tumors, and down-regulated in aging muscles. The high expression levels of GAPDH in tumors may be associated with tumor metastasis and proliferation. In this review, we cover the expression of GAPDH in tumor and aging tissues or cells, as well as the possible underlying mechanisms. We aim to provide a blueprint of GAPDH expression in these pathological and physiological processes, facilitating investigators to select a better internal reference in future molecular experiments.

Key words glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase(GAPDH); tumor; aging

收稿日期: 2017-10-17; 修回日期: 2017-12-23; 接受日期: 2018-01-13

国家自然科学基金项目(No. 81671399, No. 81170327); 广东省普通高校创新团队建设项目(No. 2015KCXTD022); 广东省普通高校特色创新类项目(No. 2015KTSCX049); 东莞市国际科技合作(含港澳台)(No. 201650812001)

* 通讯作者 Tel: 0769-22896026; E-mail: xgliu@gdmu.edu.cn

Received: October 17, 2017; Revised: December 23, 2017; Accepted: January 13, 2018

Supported by National Natural Science Foundation of China (No. 81671399, No. 81170327); Ordinary University Innovation Team Construction Project of Guangdong Province(No. 2015KCXTD022); Unique Innovative Projects in Ordinary University of Guangdong Province(No. 2015KTSCX049); Dongguan International Science & Technology Cooperation (including Hong Kong, Macao and Taiwan) Project(No. 201650812001)

* Corresponding author Tel: 0769-22896026; E-mail: xgliu@gdmu.edu.cn

甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase, GAPDH) 是糖酵解过程中的一个酶,在糖酵解中特异性催化 3-磷酸甘油醛氧化生成 1,3-二磷酸甘油酸。除了糖酵解外,GAPDH 还参与 DNA 复制和修复、核 rRNA 的输出、细胞骨架的组装、内吞、外排、凋亡、肿瘤发生等生理和病理过程^[1]。尽管 GAPDH 在蛋白质、RNA、DNA 的相关分子生物学研究中常用作标准化内参,但越来越多的研究对 GAPDH 作为内参提出质疑。Guo 等^[2]报道 GAPDH 在肺癌、肾癌、乳腺癌、胃癌、神经胶质瘤和肝癌等大部分肿瘤组织中表达上调。与正常组织相比,肿瘤细胞更依赖于有氧糖酵解以产生更多的 ATP 来维持其高增殖率,肿瘤的这一特性,被称为“瓦博格效应”(Warburg effect)^[3]。GAPDH 作为糖酵解的酶,在肿瘤细胞的增殖过程中随着糖酵解的增加而表达调高是可能的。

Lowe 等^[4]发现 GAPDH 蛋白及其 mRNA 和酶活性在衰老大鼠后肢的不同肌纤维中呈不同程度的下降。由于衰老个体会出现肌肉萎缩、力量下降,GAPDH 在衰老的肌纤维中下降,提示着 GAPDH 可能参与衰老的进程。本文就 GAPDH 在肿瘤和衰老组织中的表达情况,以及在这些组织中作为内参可能存在的问题作一简要综述。

1 甘油醛-3-磷酸脱氢酶与肿瘤

1.1 GAPDH 在肿瘤中的差异表达

GAPDH 作为管家基因,几乎在所有组织中高水平恒定表达,常常被用作 Western 印迹、PCR 等实验操作的标准化内参。但近年来大量文献对 GAPDH 作为内参提出了质疑,认为 GAPDH 在肿瘤细胞或肿瘤组织中表达上调^[1,2]。Liu 等^[5]以 β 肌动蛋白为内参,利用实时定量 PCR 和 Western 印迹技术发现,与非肿瘤组织相比,GAPDH mRNA 和蛋白质水平在肺癌组织中显著上调。Jung 等^[6]为了检测几种常用管家基因的稳定性,利用 RT-PCR 技术对肾癌组织常用管家基因进行定量,将 25 对样本所得的 CP 值制成盒形图,发现肾癌组织中 GAPDH 表达量明显高于非癌组织。为了研究胃癌组织中哪个内参最合适,Zhao 等^[7]利用实时定量 PCR 技术对 50 组胃癌组织中几种常用内参进行定量。以各基因在各样本中的平均 CT 值为标准,与癌旁组织相比,胃癌组织中 GAPDH、 β -actin、RNA 聚合酶 II (RNA polymerase II, RPII) 分别升高 6.49、5.0、3.68 倍,说明绝对恒定不变的内参是不存在的。因此,在不同

条件下选择最合适的内参显得尤为重要。Grillon 等^[8]利用免疫荧光染色技术发现,GAPDH 和线粒体外膜受体 TOM20 (translocase of outer mitochondrial membrane 20) 在大鼠神经胶质瘤中升高,并随着肿瘤浸润深度的增加二者呈现相似的增长趋势。说明 GAPDH 和 TOM20 可能共同促进了肿瘤的发展,提示神经胶质瘤中二者的增高可能与以下两种功能有关:一是产生更多的 ATP 供肿瘤细胞生长;另一种功能可能与细胞增殖有关。Chiche 等^[9]研究发现,GAPDH mRNA 水平在低度恶化的淋巴瘤中与正常组织无差异,但在高度恶化的淋巴瘤中 GAPDH 蛋白表达上调(以 Erk2 为参照,因 Erk2 在正常、低度恶化、高度恶化淋巴瘤中无变化)。进一步将过表达 GAPDH 的淋巴瘤细胞导入小鼠体内,15 d 后处死,发现与对照组相比,过表达 GAPDH 的肿瘤模型组,存活时间更短,淋巴结更大,且淋巴结中血管更丰富。其涉及的机制可能为 GAPDH 激活了 NF- κ B、低氧诱导因子-1 α (hypoxia inducible factor 1 alpha subunit, HIF-1 α) 和上调血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 来促进血管的生成。Ramos 等^[10]利用 RT-PCR (以平均 CT 值为标准)、免疫组织化学技术研究黑色素瘤 GAPDH mRNA 和蛋白质表达情况时,发现 GAPDH 的 mRNA 和蛋白质在厚度大于 1 mm 的黑色素瘤中表达量 > 厚度小于 1 mm 的瘤组织,远处转移 > 淋巴结转移,这提示了 GAPDH 的表达量与肿瘤的侵袭性转移相关,可能源于肿瘤的迁徙性转移需要有氧糖酵解提供更多的能量。同时,Hao 等^[11]利用 Western 印迹和免疫组织化学技术也发现肺鳞状细胞癌和食管癌组织中,GAPDH 蛋白表达上调,siRNA 干扰 GAPDH 表达时,肺鳞状细胞癌细胞系的增殖、迁移和侵袭能力减弱,动物实验也证实了这一结果。Mori 等^[12]研究发现,与癌旁组织相比,前列腺癌组织中 GAPDH 和 β 肌动蛋白 mRNA 水平上调(以 $2^{Ct(\text{normal}) - Ct(\text{cancer})}$ 为标准),与 β 肌动蛋白相比,GAPDH 升高更明显。Hansen 等^[13]也研究发现,GAPDH mRNA 在宫颈癌和卵巢癌中上调,其中宫颈癌中 GAPDH 升高 2.6 倍,卵巢癌中上升 4.7 倍。然而 GAPDH 并不是在每种肿瘤组织中都上调。Liu 等^[14]以 72 例肝癌患者的肿瘤组织为样本,先后分别用 HPRT1 (hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1)、CTBP1 (c-terminal binding protein 1) 为内参,发现 GAPDH mRNA 水平在肿瘤组织中均有上调,其中以 CTBP1 为内参组,37.5% 患者成 2 倍以上水平

上调,18.1%表达下调,44.4%与正常组织表达无明显差异。

因此,在肿瘤组织或肿瘤细胞中 GAPDH 作为内参应慎重,其在肿瘤中的表达上调可能与能量代谢、细胞增殖以及肿瘤的侵袭性有关。

1.2 肿瘤中 GAPDH 上调的机制

人端粒酶逆转录酶(human telomerase reverse transcriptase, hTERT)是端粒酶的催化亚基,是端粒酶的组成成分之一,对维持端粒酶的活性起着决定性的作用,hTERT 在正常人的细胞中几乎检测不到或低表达(胚胎干细胞、生殖细胞除外),但在人肿瘤细胞中普遍上调,科学家认为 hTERT 可以导致细胞的永生^[15],已有人通过外源导入 hTERT 基因,诱导人牙髓干细胞的永生^[16]。因此,hTERT 与肿瘤发生和发展密切相关。Jaiswal 等^[17]研究发现,过表达 hTERT 基因的人骨肉瘤和宫颈癌细胞导致 GAPDH 在转录水平的上调。据此推测,在肿瘤发生过程中 hTERT 可能是 GAPDH 的上游元件,促进了肿瘤中 GAPDH 的表达上调。除此之外,一些学者认为 GAPDH 的上调与肿瘤所处的低氧环境相关。肿瘤的失控生长以及高能量消耗,导致瘤细胞处在一个低氧环境,刺激低氧诱导因子(hypoxia inducible factor, HIF)上调,HIF 通过调节一系列基因的表达来保护肿瘤细胞能在低氧环境中生存^[18]。Hinkelbein 等^[19]让志愿者在海拔 2 400 m 的低氧环境中持续停留 30 min,低氧刺激导致志愿者氧饱和度由 98%降到 89.2%,以 β -actin 作参照,发现志愿者血清 GAPDH mRNA 和蛋白质水平上调。这与 Sharma^[20]发现的低氧条件下导致大鼠大脑皮层和海马回 GAPDH 蛋白升高相一致。与此相反,Rey 等^[21]干扰低氧诱导因子 1 α (HIF-1 α)后,相应的导致 GAPDH 的下降。因此,肿瘤所处的低氧环境可能是 GAPDH 升高的另一原因。

1.3 GAPDH 与肿瘤的转移和细胞增殖

上皮细胞-间充质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT),是指上皮细胞转化为具有间质表型细胞的生物学过程,这一转化,使肿瘤细胞获得更易扩散的能力。上皮-间质转化的发生伴随一系列分子的变化,如,上皮标志性蛋白 E-钙黏蛋白(E-cadherin)、 β -联蛋白(β -catenin)、细胞角蛋白(cytokeratin, CK)表达减少;间叶标志性蛋白如 N-钙黏蛋白(N-cadherin)和波形蛋白(vimentin)表达增加^[22]。除此之外,EMT 还与锌指转录因子(Snail)相关,李等^[23]通过向肺癌细胞过表达 Snail 基因,导

致肺癌细胞 A549 的体外侵袭能力增强,并发生了一系列与上皮-间质转化相关的分子变化。上皮-间质转化的发生使肿瘤细胞获得侵袭、转移能力从而导致肿瘤的扩散。为了探究 GAPDH 促进肿瘤转移的具体机制,Liu 等^[24]通过干扰人结肠癌细胞的 GAPDH,发现 GAPDH 的下降导致了 EMT 相关分子的变化,如,锌指转录因子、波形蛋白下调,E-钙黏蛋白上调。因此,肿瘤中 GAPDH 的升高可能通过调节上皮-间充质转化相关分子的表达,促进肿瘤的远端转移;Chiche 等^[9]则认为,增高的 GAPDH 通过与肿瘤坏死因子受体相关因子 2(TNF receptor associated factor 2, TRAF2)结合来提高 NF- κ B/HIF1 α /VEGFA(血管内皮生长因子 α)的表达,升高的血管内皮生长因子 α 最终通过促进血管的生成来促进肿瘤的侵袭性转移。Liu^[5]等认为肿瘤中 GAPDH 的升高,是通过促进磷酸甘油酸脱氢酶(PHGDH)的表达进而调节组蛋白 H3K9、H3K27 的甲基化,以及上调细胞周期相关蛋白质如,细胞周期蛋白 D1(cyclinD1)、CDK4、CDK6 来促进细胞的增殖。因此,肿瘤中 GAPDH 的升高,可能是通过调节上皮-间质转化、血管生成来促进肿瘤的远端转移;通过促进磷酸甘油酸脱氢酶、细胞周期相关蛋白质表达和促进组蛋白甲基化,促进肿瘤细胞增殖,最终导致肿瘤的恶化。

2 甘油醛-3-磷酸脱氢酶与衰老

以上综述了肿瘤中 GAPDH 的表达被上调,然而也有文献报道,GAPDH 在衰老的骨骼肌中表达下调。Gannon 等^[25]利用比较蛋白质组学,分析了年轻与衰老大鼠骨骼肌中蛋白质的差异性表达,并对差异比较明显的几个蛋白质进行质谱分析,结果显示,衰老的骨骼肌中 GAPDH 呈下降趋势,肌酸激酶增高,以 Akt/PKB 做内参,进一步用 Western 印迹技术证实了这一结论。Vigelsø 等^[26]为了研究几种常用内参蛋白质在不同条件下的稳定性表达,利用免染技术(stain-free technology)(一种类似于考马斯亮蓝染色的方法),免染胶内的荧光染料标记蛋白在紫外激发下 5 min 内发出可见光,从而实现总蛋白质条带在胶上的定位—对人衰老骨骼肌总蛋白质进行定量后,在同一张胶上分别用 GAPDH、 β -肌动蛋白、 α -微管蛋白特异性抗体定量几种常见内参,发现与年轻个体相比,GAPDH、 β -actin 蛋白在衰老的人骨骼肌中同样下调。Wyckelsma 等^[27]利用免染技术同样发现,GAPDH 蛋白的丰度受年龄和肌纤维的影

响,与年轻个体相比,衰老个体骨骼肌中 GAPDH 蛋白下降 30%。但是,无论年轻还是衰老个体,GAPDH 表达量在Ⅱ型肌纤维中要多于Ⅰ型肌纤维。上述结果提示,GAPDH 的表达量受年龄和肌纤维的影响,表明在衰老的骨骼肌中 GAPDH 被下调。除了骨骼肌外,GAPDH 在其他衰老的组织或细胞中的表达情况也有报道,Chen 等^[28]以衰老大鼠的肝为样本,研究衰老组织中各个内参的稳定性时发现,GAPDH mRNA 在年轻、衰老的肝组织中并无显著差异。Slagboom 等^[29]也发现,GAPDH、 β -肌动蛋白 mRNA 水平在衰老大鼠的肝和脑组织中无显著差异,但在脾组织中升高。Zampieri 等^[30]以 35~74 岁不同年龄群外周血单核细胞为研究对象,利用实时定量 PCR 技术,发现管家基因 18 s 在 70~74 年龄阶段明显下调。而其它内参,如 GAPDH、 β -肌动蛋白、HPRT1 的表达无显著差异。

因此,在衰老的肌组织和脾中内参基因 GAPDH 的稳定性相对较差,使用这些组织进行研究时内参的选择应慎重,尽量避免 GAPDH 做内参。但是 GAPDH 为什么会在衰老骨骼肌中下调? 下调后会产生什么样的作用? 却鲜有人研究,可能与衰老进程中伴随着能量代谢的变化,从而间接影响 GAPDH 的表达。

3 问题与展望

一个好的内参对蛋白质、RNA 的准确定量尤为重要。衡量一个内参的好坏是根据该基因在不同组织、不同疾病以及同一疾病的各个发展阶段,能否保持良好的稳定性有关。但越来越多的研究发现,人们最常用的内参之一 GAPDH,在某种病变或发展阶段稳定性失调,如肿瘤组织中 GAPDH 上调,衰老肌组织中 GAPDH 下调。

作为糖酵解酶 GAPDH 在能量代谢上扮演着重要角色,它在某些肿瘤中表达增强,可能反映了肿瘤的高代谢状态,GAPDH 可能与肿瘤的增殖、侵袭、能量代谢有关。从动物实验到人,结果均显示 GAPDH 在衰老的骨骼肌中表达下降。此外,鉴于 GAPDH 是糖酵解途径必不可少的酶,在糖代谢变化的过程中也将伴随 GAPDH 表达的变化。因此,在肿瘤和衰老骨骼肌以及糖代谢研究中,以 GAPDH 作为内参应慎重。但是,GAPDH 在肿瘤形成和衰老中的作用机制,以及 GAPDH 在骨骼肌外的其他衰老组织中的表达情况还未十分明朗,因此,关于 GAPDH 在各型肿瘤与衰老各组织中的表达情况及其作用机制

仍需更深入的研究。

参考文献 (References)

[1] Zhang JY, Zhang F, Hong CQ, *et al.* Critical protein GAPDH and its regulatory mechanisms in cancer cells[J]. *Cancer Biol Med*, 2015, **12**(1):10-22

[2] Guo C, Liu S, Sun MZ. Novel insight into the role of GAPDH playing in tumor [J]. *Clin Transl Oncol*, 2013, **15**(3):167-172

[3] Shafae A, Dastyar DZ, Islamian JP, *et al.* Inhibition of tumor energy pathways for targeted esophagus cancer therapy [J]. *Metabolism*, 2015, **64**(10):1193 -1198

[4] Lowe DA, Degens H, Chen KD, *et al.* Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase varies with age in glycolytic muscles of rats[J]. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, 2000, **55**(3): B160-B164

[5] Liu S, Sun Y, Jiang M, *et al.* Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase promotes liver tumorigenesis by modulating phosphoglycerate dehydrogenase [J]. *Hepatology*, 2017, **66**(2): 631-645

[6] Jung M, Ramankulov A, Roigas J, *et al.* In search of suitable reference genes for gene expression studies of human renal cell carcinoma by real-time PCR[J]. *BMC Mol Biol*, 2007, **8**:47

[7] Zhao LM, Zheng ZX, Zhao X, *et al.* Optimization of reference genes for normalization of the quantitative polymerase chain reaction in tissue samples of gastric cancer [J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2014, **15**(14): 5815-5818

[8] Grillon E, Farion R, Reuveni M, *et al.* Spatial profiles of markers of glycolysis, mitochondria, and proton pumps in a rat glioma suggest coordinated programming for proliferation [J]. *BMC Res Notes*, 2015, **8**: 207

[9] Chiche J, Pommier S, Beneteau M, *et al.* GAPDH enhances the aggressiveness and the vascularization of non-Hodgkin's B lymphomas via NF- κ B-dependent induction of HIF-1 α [J]. *Leukemia*, 2015, **29**(5):1163-1176

[10] Ramos D, Pellín-Carcelén A, Agustí J, *et al.* Deregulation of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase expression during tumor progression of human cutaneous melanoma[J]. *Anticancer Res*, 2015, **35**(1):439-444

[11] Hao L, Zhou X, Liu S, *et al.* Elevated GAPDH expression is associated with the proliferation and invasion of lung and esophageal squamous cell carcinomas[J]. *Proteomics*, 2015, **15**(17): 3087 - 3100

[12] Mori R, Wang Q, Danenberg KD, *et al.* Both beta-actin and GAPDH are useful reference genes for normalization of quantitative RT-PCR in human FFPE tissue samples of prostate cancer[J]. *Prostate*, 2008, **68**(14): 1555-1560

[13] Hansen CN, Ketabi Z, Rosenstierne MW, *et al.* Expression of CPEB, GAPDH and U6snRNA in cervical and ovarian tissue during cancer development[J]. *APMIS*, 2009, **117**(1): 53-59

[14] Liu S, Zhu P, Zhang L, *et al.* Increased glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase expression indicates higher survival rates in male patients with hepatitis B virus-associated hepatocellular carcinoma and cirrhosis [J]. *Exp Ther Med*, 2015, **9**(5):1597-1604

[15] Liu T, Li W, Lu W, *et al.* RBFOX3 promotes tumor growth and progression via hTERT signaling and predicts a poor prognosis in hepatocellular carcinoma [J]. *Theranostics*, 2017, **7**(12): 3138-3154.

[16] 高丽,王玉霞,江文欣,等. 转导 hTERT 基因致人牙髓干细胞永生化的研究[J]. *上海口腔医学* (Gao L, Wang YX, Jiang WX, *et al.* Immortalization of human dental pulp stem cells caused by transferring hTERT gene[J]. *Shanghai J Stomatol*), 2015, **24**(02):135-140

[17] Jaiswal RK, Kumar P, Sharma A, *et al.* Proteomic identification of proteins differentially expressed following overexpression of hTERT (human telomerase reverse transcriptase) in cancer cells [J]. *PLoS One*, 2017,**12**(7): e0181027

[18] Huang Y, Lin D, Taniguchi CM. Hypoxia inducible factor

- (HIF) in the tumor microenvironment: friend or foe[J]? *Sci China Life Sci*, 2017, **60**(10): 1114-1124
- [19] Hinkelbein J, Jansen S, Iovino I, *et al.* Thirty minutes of hypobaric hypoxia provokes alterations of immune response, haemostasis, and metabolism proteins in human serum[J]. *Int J Mol Sci*, 2017, **18**(9):1882
- [20] Sharma NK, Sethy NK, Bhargava K. Comparative proteome analysis reveals differential regulation of glycolytic and antioxidant enzymes in cortex and hippocampus exposed to short-term hypobaric hypoxia[J]. *J Proteomics*, 2013, **79**: 277-298
- [21] Rey MJD, Valin A, Usategui A, *et al.* Hif-1alpha knockdown reduces glycolytic metabolism and induces cell death of human synovial fibroblasts under normoxic conditions[J]. *Sci Rep*, 2017, **7**(1): 3644
- [22] 何姝瑾, 陈厚文, 熊丽霞. MicroRNA 对 EMT 的调节作用及其与肿瘤侵袭的关系[J]. *中国生物化学与分子生物学报* (He SJ, Chen HW, Xiong LX. Effects of microRNA on tumor epithelial-mesenchymal transition [J]. *Chin J Biochem Mol Biol*), 2016, **32**(11): 1197-1205
- [23] 李洪利, 尹崇高, 李文通, 等. 过表达 Snail 增强肺癌细胞 A549 的体外侵袭能力[J]. *中国生物化学与分子生物学报* (Li HL, Yin CG, Li WT, *et al.* Overexpression of snail enhances the invasive capacity of human lung cancer cell A549 in culture[J]. *Chin J Biochem Mol Biol*), 2010, **26**(10): 943-948
- [24] Liu K, Tang Z, Huang A, *et al.* Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase promotes cancer growth and metastasis through upregulation of SNAIL expression[J]. *Int J Oncol*, 2017, **50**(1): 252-262
- [25] Gannon J, Ohlendieck K. Subproteomic analysis of basic proteins in aged skeletal muscle following offgel pre-fractionation[J]. *Mol Med Rep*, 2012, **5**(4): 993-1000
- [26] Vigelsø A, Dybbøe R, Hansen CN, *et al.* GAPDH and β -actin protein decreases with aging, making Stain-Free technology a superior loading control in Western blotting of human skeletal muscle[J]. *J Appl Physiol*, 2015, **118**(3): 386-394
- [27] Wyckelsma VL, McKenna MJ, Levinger I, *et al.* Cell specific differences in the protein abundances of GAPDH and Na(+), K (+)-ATPase in skeletal muscle from aged individuals[J]. *Exp Gerontol*, 2016, **75**: 8-15
- [28] Chen J, Rider DA, Ruan R. Identification of valid housekeeping genes and antioxidant enzyme gene expression change in the aging rat liver[J]. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, 2006, **61**(1): 20-27
- [29] Slagboom PE, de Leeuw WJ, Vijg J. Messenger RNA levels and methylation patterns of GAPDH and beta-actin genes in rat liver, spleen and brain in relation to aging[J]. *Mech Ageing Dev*, 1990, **53**(3): 243-257
- [30] Zampieri M, Ciccarone F, Guastafierro T, *et al.* Validation of suitable internal control genes for expression studies in aging[J]. *Mech Ageing Dev*, 2010, **131**(2): 89-95