

张军林,郭晓红,谢立兰,等. 磷脂酶 D 及其产物磷脂酸的调控和功能研究进展[J]. 江苏农业科学,2016,44(7):15-18.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.07.004

磷脂酶 D 及其产物磷脂酸的调控和功能研究进展

张军林^{1,2}, 郭晓红^{1,2}, 谢立兰^{1,2}, 梅 辉^{1,2}, 李 毅^{1,2}

[1. 武汉生物工程学院生物科学与技术学院应用生物技术研究中心,湖北武汉 430415;

2. 湖北省病毒载体(基因治疗)工程技术研究中心,湖北武汉 430415]

摘要:磷脂酶 D 是广泛存在于动植物各种组织和细胞中的一类磷酸二酯酶,自身及其代谢产物磷脂酸可以调控细胞内许多生理生化活动,例如细胞内囊泡运输、细胞表面受体的信号传导和细胞骨架蛋白重组等。本文主要讨论哺乳动物磷脂酶 D 家族的分子生物学特点,及其代谢产物磷脂酸在磷脂酶 D 调控细胞生理和代谢性疾病上所发挥的重要作用。

关键词:磷脂酶 D; 磷脂酸; 细胞调控; 囊泡融合

中图分类号: Q556 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2016)07-0015-04

磷脂酶 D(phospholipase D, PLD) 最先是在胡萝卜提取物中发现的,具有磷酸二酯酶的活性,可以专一地水解卵磷脂产生脂质第二信使磷脂酸(phosphatidic acid, PA)和胆碱。PLD 超家族成员广泛存在于病毒、细菌、酵母菌、植物及动物体中。在哺乳动物细胞中,除白细胞和少数淋巴细胞外,均有 PLD 活性存在。20 世纪 90 年代,研究人员克隆了 PLD 基因,发现 PLD 的活性及其代谢产物对动物的生理过程和某些疾病发生产生影响,如炎症、糖尿病、细胞骨架重建、囊泡运输和胞外分泌、肿瘤形成,以及嗜中性粒细胞氧化呼吸链的阻断等。这些发现均来自于 PLD 的磷酸基团转移作用,即在有水或一级醇(如乙醇、丁-1-醇)存在时,PLD 能催化水解卵磷脂产生 PA 和磷脂酰乙醇或磷脂酰丁-1-醇。PA 作为 PLD 在细胞中的主要代谢产物,在细胞内受到严格的调控。PA 还可以被转化成为另外 2 个具有生物活性的脂质分子,甘油二酯(diacylglycerol, DAG)和溶血磷脂酸(phosphatidic acid, LPA)。PA 与这 2 个活性分子参与细胞中骨架蛋白重建、囊泡运输和受体信号传导等重要生理过程。本文主要讨论哺乳动物 PLD 代谢的前体和产物,尤其是磷脂酸在 PLD 功能发挥中的作用。

收稿日期:2015-06-11

基金项目:国家自然科学基金青年科学基金(编号:31302148)。

作者简介:张军林(1981—),男,博士,副研究员,主要从事磷脂酶 D 调控与病毒载体改造方面的研究。E-mail: junlinx@163.com。

通信作者:李 毅,博士,教授,主要从事细小病毒分类和分子生物学研究。E-mail: johnli2668@hotmail.com。

1 磷脂酶 D 家族分子生物学特点

从植物、细菌和哺乳动物中克隆的磷脂酶 D 组成一个基因家族,具有一系列高度保守序列和特征,这个基因家族包括细菌 PLD、磷酸转移酶/磷脂合成酶、核酸内切酶和一些病毒外壳结构蛋白。目前对动物体中对 PLD1、PLD2 的研究较多,主要关注点是磷脂酰胆碱专一性磷脂酶 D 在糖尿病中性粒细胞和心脏、血管、肾脏、神经组织细胞中的酶活性改变,及其引起糖尿病各种并发症改变的信号传导途径。PLD3、PLD4、PLD5 基因是最近克隆出来的,它们具有与 PLD1、PLD2 相似的功能域(图 1),但其功能和表达调控的研究才刚刚开始。总之,PLD 作为细胞信号传导中重要的酶分子,参与了细胞功能的诸多方面,其具体的作用机制研究成为目前关注的热点。

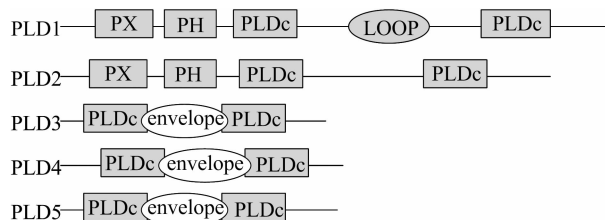


图1 哺乳动物 PLD 家族的主要功能域

1.1 磷脂酶 D 家族的分子结构

所有克隆得到的真核生物 PLD 都具有一个相对保守的核心催化功能域(PLDc)、N-末端、C-末端区域。PLD 催化核心域一般有 I ~ IV 个域组成。在这 4 个短序列区域中,域

[51] 李月兴,张宝丽,魏永霞. 秸秆覆盖的土壤温度效应及其对玉米生长的影响[J]. 灌溉排水学报,2011,30(2):82-85.

[52] Sarkar S, Singh S R. Interactive effect of tillage depth and mulch on soil temperature, productivity and water use pattern of rainfed barley (*Hordium vulgare* L.) [J]. Soil & Tillage Research, 2007, 92(1/2):79-86.

[53] 邹聪明,王国鑫,胡小东,等. 秸秆覆盖对套作玉米苗期根系发育与生理特征的影响[J]. 中国生态农业学报,2010,18(3):496-500.

[54] 朱自玺,刘荣花. 秸秆覆盖农田的小气候特征和增产机理研究

[J]. 干旱地区农业研究,2009,27(6):123-128.

[55] Li R, Hou X Q, Jia Z K, et al. Effects on soil temperature, moisture, and maize yield of cultivation with ridge and furrow mulching in the rainfed area of the Loess Plateau, China [J]. Agricultural Water Management, 2013, 116(1):101-109.

[56] 鲁向晖,高 鹏,王 飞,等. 宁夏南部山区秸秆覆盖对春玉米水分利用及产量的影响[J]. 土壤通报,2008,39(6):1248-1251.

[57] Ma Z M. Effects of watermelon replanting on yield and quality and soil quality of sandy land [J]. Gansu Agric Sci Technol, 2011, 6:5-8.

I 和域 II、域 III、域 IV 具有特别相似的结构。保守域 II 和 III 之间插入的不同非保守片段也说明了这一点,并且这些插入片段或者 Loop 区对于人 PLD1 活性并非必需。除了域 I ~ IV 域,在酵母、人和线虫的序列中仍有其他的结构域,如核心催化功能域 HKD 基序,N 末端的 PX 域(phox domain)和 PH 域(pleckstrin domain)。PLD 家族成员都具有一个保守序列(HXKX₄DX₆GG/S),它具有的催化活性使得 PLD 家族成员有相似的作用机理。HKD 基序在 PLD 家族中具有高度保守性。对 PLD1、PLD2 的研究表明,HKD 基序中的组氨酸、赖氨酸、天冬氨酸、甘氨酸、丝氨酸残基是催化作用所必需的。HKD 基序是 PLD 的标志序列,具有催化水解的活性。这意味着真核生物 PLD 基因可能由同一基因经过复制和融合等基因重组过程进化而来。

有研究表明,PH 域对于蛋白质的定位至关重要,序列缺失和定点突变会导致该蛋白不能在细胞内正确定位。PH 域介导 PLD1 结合到脂质筏上,促进该酶的早期复性从而使其转位到内涵体的质膜上^[1]。删除 PH 域并不影响 PLD 的酶活性,也不改变 PLD 催化反应对 PI-4,5-P₂ 依赖性,这导致了 PI-4,5-P₂ 结合基序的发现^[2]。研究发现,PLD 的 PX 域能够介导蛋白质-蛋白质相互作用或者结合磷酸肌醇^[3]。与其他磷酸肌醇单磷酸(如 PI5P)明显不同,PX 域能够优先与磷酸肌醇三磷酸结合^[4]。相反,在脂质体结合分析中 PX 域却与 PI5P 优先结合,由于 PI5P 是细胞内吞所需要的脂质体,这有利于 PLD1 从质膜进入吞噬泡。与 PLD2 不同,PLD1 具有保守的 LOOP 域,这一功能域具有负调控元件的作用,将该功能域缺失会导致 PLD1 的活性下降 3 倍。对 PLD3、PLD4、PLD5 进行蛋白质功能域预测分析,发现它们都没有 PH 和 PX 功能域,但却均在 2 个催化活性域之间多出 1 个 envelope 功能域。envelope 功能域一般存在于病毒包膜蛋白中,而结合在质膜上的 PLD 通常通过把磷脂转化成磷脂酸来改变细胞膜的脂质结构,从而调节细胞内的脂质运动,这预示着这 3 个磷脂酶 D 很有可能具有不同于 PLD1、PLD2 的功能。

1.2 磷脂酶 D 的细胞定位

PLD1 和 PLD2 在细胞中的定位是不同的。通过研究不同细胞系发现,PLD1 主要分布于核周际,如高尔基体、内质网或后期囊泡^[5]。也有观点相反的报道认为,PLD1 只分布于后期囊泡和溶酶体中,高尔基体中就没有 PLD1 的分布^[6],而在未被刺激的细胞中,PLD1 只分布于质膜^[7]。但是现在研究发现,受到外界刺激后 PLD1 会转移到质膜^[8]。实际上,由于细胞系囊泡循环的频率和数量不同以及 PLD1 调控的定位,只能以细胞内 PLD1 动态循环的概念来解释。

PLD2 主要分布于质膜^[9],同时在胞质、囊泡体^[10]和 β 肌动蛋白^[11]中也有分布。在血清和表皮生长因子(EGF)刺激下 PLD2 会转移到细胞膜褶皱上。

2 PLD 代谢产物 PA 的功能

PLD 水解产生的 PA 参与多方面的细胞代谢功能。PA 既可以在细胞信号转导中起作用,如参与磷酸肌醇激酶的激活或作为蛋白质的脂类结合伴侣募集蛋白质等过程。PA 也可以通过前面所述途径被转化成具有生物活性的脂质分子 DAG 和 LAP,参与细胞内信号传导的调节。同时,PA 在囊泡

运输、内吞作用和分泌过程中都发挥着重要作用。总之,PA 在以上这些过程中的功能通常是作为第二信使、脂类船坞和增融性脂质功能的联合,以下将分别讨论。

2.1 PA 作为第二信使的作用

PA 参与细胞内信号传导,包括激活 PI4P 5-激酶,激活哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR),以及与 Raf 激酶结合等许多通路。PA 的 1 个重要下游靶标是 I 型 PI4P 5-激酶,它可以催化 PI4P 产生 PI-4,5-P₂。与其他脂类分子相比,只有 PA 可以在体外激活牛脑中提取的 PI4P 5-激酶。后来研究表明,PA 只能激活 I 型而非 II 型 PI4P 5-激酶。I 型 PI4P 5-激酶第 3 个变体的克隆和研究也证实了这一说法,并且这一过程与体内肌动蛋白聚合调控相关^[12]。EGF 介导 PLD2 的活化和转位导致质膜褶皱中 PA 的大量积累,从而激活质膜上 PI4P 5-激酶来促进褶皱的产生。不但 PLD 产生的 PA 可以激活 I 型 PI4P 5-激酶 α ,而且 PA 的转化产物 LPA 处理猪动脉血管内皮细胞也能激活 I 型 PI4P 5-激酶 α ^[13]。另外,PA 双酰基链的组成也是 PA 研究的一个方面。双酰基链 PA(8:0)对 PI4P 5-激酶具有相似的激活效率^[14]。有研究表明,蛋黄提取物具有混合酰基链的 PA,也能激活 PI4P 5-激酶。因此,PA 作为细胞内重要的信号传递分子,与其来源和酰基链的组成无关。

PLD 与细胞抗凋亡的多种生存信号通路有关。作为细胞周期和增殖效应器的 mTOR 就是 PLD 抗凋亡的下游激活因子。在血清刺激下 HEK293 细胞内 PA 瞬时增加,从而导致 mTOR 及其下游蛋白 S6 激酶 I(S6K I)的激活。体外研究发现,PA 可以与 mTOR 在 12-雷帕霉素结合域 FK506 直接作用^[15],与脂类分子(PC、PS、PE、PI 和 PIPs)相比,PA 具有专一性。用 mTOR 抑制剂雷帕霉素处理细胞能够阻滞 PA 与 mTOR 作用,说明 PA 与雷帕霉素是竞争性结合的。超表达 PLD2 能够阻滞雷帕霉素,从而抑制细胞增殖,进一步说明 PLD 与 mTOR 调控有关^[16]。脂多糖(lipopolysaccharides, LPS)可以刺激胞内 PA 增加,这一过程对 mTOR 激活介导的细胞因子的释放具有重要作用。佛波脂能加强细胞因子的释放,而丁-1-醇却阻滞这一过程,也说明 PLD2 参与其中。然而,有研究表明 PLD1 是 mTOR 信号的效应酶,并且也是 Cdc42 的下游分子。在血清刺激下,超表达衍生型 PLD1 能加强 S6K I 的活性,而无活性 PLD1 的表达相对与对照组会减低 S6K I 的活性。另外,干扰 RNA(siRNA)干扰 2 种细胞系中 PLD1 能够基本完全抑制血清刺激下 S6K I 的激活^[17]。最近有研究发现,PLD1 确实是 mTOR 激活的必需酶^[18]。综上,mTOR 是 PLD1 产生 PA 的确定靶标,并且这一途径与磷酸肌醇 3 激酶生存通路同时存在。

2.2 PA 是脂类合成前体

PA 能经磷脂酸磷酸水解酶(phosphatidic acid phosphohydrolase, PAP)转化生成脂质第二信使 DAG。PAP 的变体 PAP2b 经常出现在 PLD2 富集的膜区域,很有可能促进 PLD 生成的 PA 快速转化成 DAG。DAG 能够激活经典型和大多数 PKC 家族成员。PAP 转化 PA 生成 DAG 的种类由 PA 二酰基链的饱和度决定。值得注意的是,随着 DAG 的饱和度增高,便不能在体内激活 PKC。因此,虽然这些高饱和度的 DAG 的作用还不清楚,但是它至少是削弱 PLD 生成 PA 信号的一种

有效途径。PA 也可以通过磷脂酶 A 转化成单酰基的 LPA。LPA 是一种有效的有丝分裂原,在细胞增殖、迁移和生存等过程中具有重要作用。但是有关 PLD 产生的 PA 转化的 LPA 和 DAG 的具体作用还有待研究。

2.3 PA 在囊泡运输、吞噬作用和胞外分泌中的功能

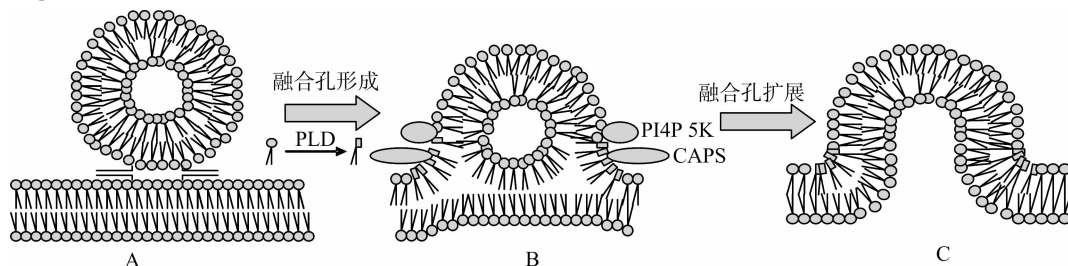
PLD 及其产物 PA 与细胞内囊泡运输、吞噬作用和胞外分泌等功能密切相关。PLD 可以通过激活 ARF 促进高尔基体分泌泡形成。用一级醇(如乙醇)可以阻滞蛋白质从内质网到高尔基体的运输,但外加含有 PA 的脂质体能减弱这一过程。PA 对蛋白质的募集依赖于高尔基体反式面分泌泡的形成。但是 PLD 在囊泡形成中的作用仍不清楚,PLD 在高尔基体上的定位也有待于进一步研究。

相反,PLD 在分泌泡形成和胞外分泌中的作用却比较清楚,这一过程主要依赖于 ARF 的激活。这些过程都曾在神经内分泌细胞、脂肪细胞、胰腺 β 细胞和肥大细胞做过研究^[8,19]。在神经内分泌细胞中,ARF6 专一性的通过 PLD1 依赖的 PI-4,5-P₂ 途径启动胞外分泌。最新研究表明,神经内分泌细胞的过程是通过 PLD1 的 PH 域调控,并且 PLD 也与人支气管上皮细胞中鞘氨醇 1-磷酸诱导的白介素-8 分泌有关^[9]。

PLD2 是细胞内吞作用中受体信号向胞内传导的重要媒介。表皮生长因子受体信号的传导能被丁-1-醇阻滞,并且 EGF 与受体结合后会促使胞内 PA 含量的增高,这都说明 PLD 参与其中。PLD1 和 PLD2 的超表达均能引起受体信号的加强,而它们失活型的超表达均引起受体胞内信号的减弱^[20]。 μ -opioid 受体 MOR1 与 PLD2 也有一定的功能性联

系。研究发现,能加强胞吞作用的受体会激活 PLD2,而其他受体均不能激活 PLD2。另外,受体信号的向内传导是 ARF 依赖性的^[21]。由于 MOR1 信号的向胞内传导会被丁-1-醇或失活型 PLD2 的超表达阻滞,因此 PLD2 在受体信号向胞传导中具有一定作用^[21]。丁-1-醇和 siRNA 干扰 PLD2 均能阻滞谷氨酸受体介导的胞吞作用^[22]。失活型 PLD2 的超表达和用 siRNA 干扰 PLD2 也均能阻滞血管紧张素 II 受体信号引起的胞吞作用^[9]。总之,受体的胞吞是 PLD2 在细胞内功能的重要体现。

PLD 催化水解 PC 生成的 PA 具有促进细胞内囊泡运输等很多功能(图 2)。PA 能够作为脂质船坞募集蛋白,激活 PI4P5-激酶生成 PI-4,5-P₂,具有增进质膜上脂质融合的作用。生成的 PI-4,5-P₂ 通过募集 CAPS 促进密集的囊泡进行胞外分泌^[23]。由于 PLD 将非增溶性脂质 PC 转化成增溶性脂质 PA,PLD 在脂质融合中的功能倍受重视。PA 的头部基团和脂质酰基链较小,也可以最大限度地降低内膜曲面形成负曲率的活化能^[24]。PA 同样可以更进一步形成另外 2 种增溶性脂类 DAG 和 LPA^[25]。LPA 能够通过 PI3K/PKC ζ 通路激活 PLD 的活性^[26],也能促进 PA 所在膜反面曲率的形成^[27]。LPAAT 酶、endophilin 又可以将 PLA 转化生成 PA 从而促进细胞内吞^[28]。也有研究发现,添加 PA 能提高囊泡的融合率^[29]。抑制 PLD1 的活性会减少质膜外围小叶上葡萄糖转运酶的数量,却不能阻滞囊泡向质膜的运输,这说明 PA 的生成缺乏会导致膜融合受阻^[8]。综上所述,PLD 生成的 PA 及其进一步的代谢产物(如 PLA)在质膜融合和膜上囊泡形成中具有重要作用。



A—囊泡接触到质膜时,PLD 催化 PC 生成 PA;B—融合孔在囊泡和质膜间形成。质膜上的 PA 能降低内膜曲面形成的活化能,同时 PA 可以激活质膜上的磷酸肌醇 4 磷酸 5 激酶(PI4P5K),从而增加膜上 PI-4,5-P₂ 的水平 and 募集 CAPS 蛋白质。C—融合孔完全形成

图2 囊泡融合到质膜

3 结论与展望

随着对 PLD1、PLD2 的深入研究,以及最近对 PLD3、PLD4、PLD5 的克隆,哺乳动物 PLD 的研究取得了重要进展。确定 PLD1、PLD2 许多功能性基序和蛋白域,对加深了解 PLD 调控规律和体内功能具有重要意义。PLD 涉及到的细胞内反应与许多生理和病理过程相关,如在糖尿病及其并发症中许多组织也有 PLD 功能紊乱的迹象;PLD 在神经退行性疾病中减轻神经细胞的凋亡、诱导神经细胞分化填补损伤区域及促进神经递质释放方面都起到一定的作用;PLD 通过血管紧张素 II、去甲肾上腺素、氧化型低密度脂蛋白和多巴胺受体 D5 等分子参与高血压的发生;PDL 也参与 I 型和 II 型肌纤维中由胰岛素或肌肉收缩引起的肌细胞葡萄糖跨膜转运的信号转导系统;在许多肿瘤组织中,PLD 的活性异常升高,大量的研

究表明 PLD 与肿瘤的关系密切。因此,PLD 已被广泛认为是目前药物分子设计的重要靶标,加快对它相关功能和特征的研究就有重要意义。

PLD 参与的信号通路主要是与 PA 相互作用的靶标蛋白质及其功能有关,因此与 PA 直接作用的蛋白质的研究成为目前研究的热点,它们之间相互作用至少有 2 个功能,即调控酶的活性、募集特定膜蛋白。理论模型研究表明,PA 在 PLD 功能发挥如质膜融合中具有一定的作用。PA 敏感蛋白 TAPAS1、酵母 Opilp 的发现有助于更好地确定细胞内 PA 水平的变化及其与 PLD 和靶标的协调作用^[30]。用质谱分析等先进的脂质检测方法可以分辨出一定刺激下细胞内 PA 分子种类的变化,确定出 PA 是来源于二酰甘油激酶作用多不饱和和 PA 还是 PLD 酶解单不饱和和 PC 或饱和 PC。随着质谱分析灵敏度的提高,就可以通过分离亚细胞结构进一步分析 PA

的分子种类和分布,对 PA 的深层次研究有助于对 PLD 更加全面地了解。

参考文献:

- [1] Du G, Altschuller Y M, Vitale N, et al. Regulation of phospholipase D1 subcellular cycling through coordination of multiple membrane association motifs[J]. *The Journal of Cell Biology*, 2003, 162(2): 305 – 315.
- [2] Sciorra V A, Rudge S A, Prestwich G D, et al. Identification of a phosphoinositide binding motif that mediates activation of mammalian and yeast phospholipase D isoenzymes[J]. *The EMBO Journal*, 1999, 18(21): 5911 – 5921.
- [3] Xu Y, Seet L F, Hanson B, et al. The Phox homology (PX) domain, a new player in phosphoinositide signalling[J]. *The Biochemical Journal*, 2001, 360(Pt 3): 513 – 530.
- [4] Stahelin R V, Ananthanarayanan B, Blatner N R, et al. Mechanism of membrane binding of the phospholipase D1 PX domain[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2004, 279(52): 54918 – 54926.
- [5] De Souza L, Pinto da Silva L L, Jamur M C, et al. Phospholipase D is involved in the formation of Golgi associated clathrin coated vesicles in human parotid duct cells[J]. *PLoS One*, 2014, 9(3): e91868.
- [6] Hughes W E, Parker P J. Endosomal localization of phospholipase D 1a and 1b is defined by the c – termini of the proteins, and is independent of activity[J]. *Biochemical Journal*, 2001, 356(3): 727 – 736.
- [7] Kim J H, Kim Y, Lee S D, et al. Selective activation of phospholipase D2 by unsaturated fatty acid[J]. *FEBS Letters*, 1999, 454(1/2): 42 – 46.
- [8] Huang P, Altschuller Y M, Hou J C, et al. Insulin – stimulated plasma membrane fusion of Glut4 glucose transporter – containing vesicles is regulated by phospholipase D1[J]. *Molecular Biology of the Cell*, 2005, 16(6): 2614 – 2623.
- [9] Hsu Y L, Hung J Y, Ko Y C, et al. Phospholipase D signaling pathway is involved in lung cancer – derived IL – 8 increased osteoclastogenesis[J]. *Carcinogenesis*, 2010, 31(4): 587 – 596.
- [10] Divecha N, Roefs M, Halstead J R, et al. Interaction of the type I alpha PIPkinase with phospholipase D: a role for the local generation of phosphatidylinositol 4,5 – bispophosphate in the regulation of PLD2 activity[J]. *The EMBO Journal*, 2000, 19(20): 5440 – 5449.
- [11] Lee S, Park J B, Kim J H, et al. Actin directly interacts with phospholipase D, inhibiting its activity[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2001, 276(30): 28252 – 28260.
- [12] Liu Y, Su Y, Wang X. Phosphatidic acid – mediated signaling[J]. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 2013, 991(3): 159 – 176.
- [13] Jones D H, Morris J B, Morgan C P, et al. Type I phosphatidylinositol 4 – phosphate 5 – kinase directly interacts with ADP – ribosylation factor 1 and is responsible for phosphatidylinositol 4,5 – bispophosphate synthesis in the golgi compartment[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2000, 275(18): 13962 – 13966.
- [14] Arisz S A, Munnik T. Distinguishing phosphatidic acid pools from de novo synthesis, PLD, and DGK[J]. *Methods in Molecular Biology*, 2013, 1009: 55 – 62.
- [15] Jaafar R, Larichaudy J D, Chanon S, et al. Phospholipase D regulates the size of skeletal muscle cells through the activation of mTOR signaling[J]. *Cell Communication and Signaling*, 2013, 11(3): 55.
- [16] Cheol S J, Woo K D, Mo Y K, et al. Phospholipase D inhibitor enhances radiosensitivity of breast cancer cells[J]. *Experimental & Molecular Medicine*, 2013, 45(8): e38.
- [17] Fang Y, Park I H, Wu A L, et al. PLD1 regulates mTOR signaling and mediates Cdc42 activation of S6K1[J]. *Current Biology*, 2003, 13(23): 2037 – 2044.
- [18] Foster D A, Salloum D, Menon D, et al. Phospholipase D and the maintenance of phosphatidic acid levels for regulation of mTOR[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2014, 289(33): 22583 – 22588.
- [19] Koch T, Brandenburg L O, Schulz S, et al. ADP – ribosylation factor – dependent phospholipase D2 activation is required for agonist – induced mu – opioid receptor endocytosis[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2003, 278(11): 9979 – 9985.
- [20] Moreau K, Ravikumar B, Puri C, et al. Arf6 promotes autophagosome formation via effects on phosphatidylinositol 4,5 – bispophosphate and phospholipase D[J]. *The Journal of Cell Biology*, 2012, 196(4): 483 – 496.
- [21] Koch T, Brandenburg L O, Liang Y, et al. Phospholipase D2 modulates agonist – induced mu – opioid receptor desensitization and resensitization[J]. *Journal of Neurochemistry*, 2004, 88(3): 680 – 688.
- [22] Bhattacharya M, Babwah A V, Godin C, et al. Ral and phospholipase D2 – dependent pathway for constitutive metabotropic glutamate receptor endocytosis[J]. *The Journal of Neuroscience*, 2004, 24(40): 8752 – 8761.
- [23] Brown D, Weyer P, Orci L. Nonclathrin – coated vesicles are involved in endocytosis in kidney collecting duct intercalated cells[J]. *The Anatomical Record*, 1987, 218(3): 237 – 242.
- [24] Bothe I, Deng S, Baylies M. PI(4,5)P2 regulates myoblast fusion through Arp2/3 regulator localization at the fusion site[J]. *Development*, 2014, 141(11): 2289 – 2301.
- [25] Jun Y, Fratti R A, Wickner W. Diacylglycerol and its formation by phospholipase C regulate Rab – and SNARE – dependent yeast vacuole fusion[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2004, 279(51): 53186 – 53195.
- [26] Gayral S, Délérès P, Laulagnier K, et al. Selective activation of nuclear phospholipase D – 1 by G protein – coupled receptor agonists in vascular smooth muscle cells[J]. *Circulation Research*, 2006, 99(2): 132 – 139.
- [27] Zhai X, Mømsen W E, Malakhov D A, et al. GLTP – fold interaction with planar phosphatidylcholine surfaces is synergistically stimulated by phosphatidic acid and phosphatidylethanolamine[J]. *Journal of Lipid Research*, 2013, 54(4): 1103 – 1113.
- [28] Reutens A T, Begley C G. Endophilin – 1: a multifunctional protein[J]. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 2002, 34(10): 1173 – 1177.
- [29] Baba T, Kashiwagi Y, Arimitsu N, et al. Phosphatidic acid (PA) – preferring phospholipase A1 regulates mitochondrial dynamics[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2014, 289(16): 11497 – 11511.
- [30] Loewen C J, Gaspar M L, Jesch S A, et al. Phospholipid metabolism regulated by a transcription factor sensing phosphatidic acid[J]. *Science*, 2004, 304(5677): 1644 – 1647.