

外源性 *SHIP* 基因表达抑制生长因子介导的 K562 细胞增殖及 Akt 磷酸化

杨琳¹, 罗建民^{1*}, 温树鹏¹, 刘小军², 姚丽¹, 杨敬慈¹, 杜行严¹

(1. 河北医科大学第二医院血液科, 河北 石家庄 050000; 2. 美国印第安纳大学肿瘤研究所, 美国 印第安纳 46202)

摘要:【目的】探讨 *SHIP* 基因对 IL-3 诱导 K562 细胞系增殖的抑制作用, 阐明 *SHIP* 对 K562 细胞作用的机制。【方法】将慢病毒质粒 pReceiver-Lv31-FIV 和 pReceiver-Lv31-*SHIP* 转染 K562 细胞; 转染细胞与 IL-3 共培养, Western blot 法检测 K562 细胞 Akt 磷酸化; 观察转染野生型 *SHIP* 基因对 K562 细胞增殖的影响; 末端脱氧核苷酸转移酶介导的 dUTP 缺失末端标记(TUNEL)法检测细胞凋亡。【结果】重组慢病毒载体 pReceiver-Lv31-FIV 和 pReceiver-Lv31-*SHIP* 转染 K562 细胞, GFP 阳性率为 74.6%。野生型 *SHIP* 基因阻断了 IL-3 对 K562 细胞的增殖作用, 对照组(K562/FIV)细胞增殖抑制率(3.26%)明显低于转染 *SHIP* 基因组细胞增殖抑制率(26.42%, $P < 0.05$); 集落形成实验显示 *SHIP* 能显著抑制 K562 细胞集落形成能力[IL-3 作用组 K562/*SHIP* 细胞形成集落为 60.3 ± 6.6 , 明显低于 IL-3 诱导的 K562/FIV 组(91.7 ± 4.2)]($P < 0.01$)。细胞形态观察发现凋亡增加, Western blot 检测发现转染 *SHIP* 基因组前凋亡酶 pro-caspase-3 降解增加, TUNEL 法证实 *SHIP* 蛋白促进细胞凋亡。IL-3 作用不同时间段(3 h, 6 h, 12 h), 转染野生型 *SHIP* 组细胞增殖明显减弱, 且 Akt 磷酸化水平均低于对照组($P < 0.05$)。【结论】*SHIP* 基因负调控生长因子(IL-3)介导的 K562 细胞增殖及其蛋白激酶活化。

关键词: 基因, 肌醇 5' 磷酸酶; 慢病毒载体; 细胞增殖; 磷酸化蛋白激酶 B; 生长因子

中图分类号: R329.28 文献标识码: A 文章编号: 1672-3554(2009)03-0269-06

SHIP Inhibits Growth Factor-mediated K562 Cells Proliferation and Its PKB/Akt Activation

YANG Lin¹, LUO Jian-min¹, WEN Shu-peng¹, LIU Xiao-jun^{2*}, YAO Li¹, YANG Jing-ci¹, DU Xing-yan¹

(1. Hebei Key of Laboratory of Hematology, Department of Hematology, The Second Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050000, China; 2. USA Cancer Research institute at Indiana University School of Medicine, Indiana USA)

Abstract: 【Objective】To explore the inhibitory effects of *SHIP* on IL-3 stimulated K562 cell proliferation, and to elucidate the mechanism of *SHIP* functioning on K562 cells. 【Methods】pReceiver-Lv31-FIV and pReceiver-Lv31-*SHIP* plasmids were transfected into K562 cells, and the K562 cells were cultured with IL-3. Phosphorylated Akt of K562 cells was examined by Western blot. The proliferation of K562 cells transfected with *SHIP* or empty vector were examined. The apoptosis of K562 cells was examined by TUNEL and Western blot. 【Results】74.6% GFP positive cells were obtained in *SHIP* group, 3.26% in FIV group ($P < 0.05$). *SHIP* protein inhibited the colony formation retroviral vector *SHIP*-FIV transfected K562 cells. The anti-proliferative rate in K562/FIV (3.26%) was significantly lower than that in K562/*SHIP* cells (26.42%); the colony formation capacity of K562 decreased after transfected with *SHIP* (IL-3* K562/*SHIP* group 60.3 ± 6.6 vs IL-3* K562/FIV group 91.7 ± 4.2 , $P < 0.05$). An increase in the cells with morphologic features of apoptosis was also proved by TUNEL in *SHIP*-expressing cells. Western blot analysis showed *SHIP* down-regulated expression of pro-caspase-3. The level of phosphorylated Akt was decreased after stimulated by IL-3 for 1 h, and almost disappeared after stimulated for 24 h. The effect of IL-3 on K562 cell proliferation was inhibited by the transfected wild-type *SHIP* gene. The phosphorylated Akt in K562 cells were inhibited by the transfected *SHIP* gene at different time points. 【Conclusion】*SHIP* is a negative regulator of IL-3-mediate PKB activation and K562 cell survival.

Key words: gene, *SHIP*; lentiviral vector; cell proliferation; p-Akt; IL-3

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2009, 30(3):269-274]

收稿日期: 2008-11-26

基金项目: 国家自然科学基金(30240011); 河北省自然科学基金(2007000858)

作者简介: 杨琳, 博士研究生, 副教授, 副主任医师, E-mail: ylhbsjz@163.com; * 通讯作者, 罗建民, 教授, 博士研究生导师, E-mail: Luoym315@yahoo.com.cn

SHIP (SH2 domain containing inositol 5'-phosphatase) 基因属于肌醇 5' 磷酸酶家族, 仅限于造血细胞特异性表达, 在生长因子调节细胞生存的 Akt 活化中起重要负调控作用^[1]; 急性白血病中 PI3K/Akt 路径的异常活化在白血病细胞增殖中发挥重要作用。罗建民等^[2,3]首次发现急性白血病细胞中存在 *SHIP* 基因显性负性突变; 我们前期研究^[4,5]也表明 K562 细胞中 bcr/abl 抑制 *SHIP* 基因表达, 封闭 bcr/abl 作用后, *SHIP* 基因表达水平升高, p-Akt 水平下调; 这些均提示 *SHIP* 基因表达缺失可能与白血病发病有关。本研究利用慢病毒载体将 *SHIP* 基因导入 K562 细胞, 使其稳定表达 *SHIP* 基因, 并应用 IL-3 诱导 K562, 探讨 *SHIP* 基因改变及功能的丢失在抑制生长因子诱导的白血病细胞增殖中的作用。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 主要试剂和材料 采用三质粒慢病毒载体系统, 载体质粒 pReceiver-Lv31 含巨细胞病毒 (CMV) 启动子及绿色荧光蛋白 (green fluorescent protein, GFP); 包装质粒 FIV 和 VSG 由本室前期构建并测序鉴定。小量质粒提取试剂盒购自天根生物公司; 细胞培养基 DMEM、RPMI 1640 购自 Gibco 公司; 胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS) 购自 HYCLONE 公司; 胰蛋白酶购自上海生物工程技术服务有限公司; 绝对荧光定量 PCR 试剂盒 (针对 *SHIP*) 由达安基因公司设计合成 (基因序列来自基因库, 获取号 M77273)。p-Akt(Thr³⁰⁸, Ser⁴⁷³) 抗体、Akt 抗体、SHIP 抗体、pro-caspase3 抗体、 β -actin 抗体购自 Santa Cruz 公司。Lipofectmine 2000 购自美国 Introvigen 公司。IL-3 购自 Sigma 公司。全自动酶标仪为美国的 Bio-Rad Model 550。四唑氮蓝 (MTT) 为美国 Sigma 公司产品。

1.1.2 培养细胞实验分组 人胚肾细胞系 293T 包装细胞系购自中国医学科学院血液研究所, 用于慢病毒扩增, 用含 100 mL/L 的 FBS 的高糖 DMEM 培养基培养。人慢性粒细胞白血病急变细胞系 K562 为本室长期保存, 用含 100 mL/L 的 FBS 的 RPMI 1640 培养基, 加入青霉素 (100 U/mL) 和链霉素 (100 μ g/mL) 的培养体系, 均在 37 $^{\circ}$ C, 体积分数 5% CO₂, 饱和湿度环境孵育。实

验分 3 组: 转染 *SHIP* 基因的 K562 细胞 (K562/*SHIP*) 为实验组, 转染空载体 K562 细胞 (K562/*FIV*) 和亲代 K562 细胞为对照组。每组又分为 2 个亚组, 即各转染组无血清孵育 10 h 后加 IL-3 (终浓度为 5 ng/mL) (IL-3⁺K562) 或不加 IL-3 组 (IL-3⁻K562)。

1.2 慢病毒包装并检测滴度

采用脂质体 Lipofectamine2000 将 3 种质粒共转染 293T 包装细胞, 其中载体质粒 pReceiver-Lv31-*SHIP* 10 μ g、*FIV* 10 μ g、*VSG* 10 μ g, 36 h 后荧光显微镜观察 GFP 表达情况, 48 ~ 72 h 离心取细胞加入 1 \times PBS 在液氮中反复冻融 3 ~ 4 次离心取上清, 过滤后用无血清 DMEM 作 10⁻¹ ~ 10⁻⁶ 倍稀释, 在 6 孔板中分别接种 22 \times 10⁶ 的 293T 细胞, 将 1 mL 稀释病毒液分别加入到相应的孔中。培养 48 h 后荧光显微镜下观察各浓度孔 GFP 表达并计数。

1.3 慢病毒感染 K562 细胞系

常规将细胞悬浮于含 2 μ g/mL PHA、200 mL/L FBS 的 RPMI 1640 培养基中, 37 $^{\circ}$ C、体积分数 5% CO₂ 培养 72 h。取 6 \times 10⁶/mL 的处于对数生长期的 K562 细胞与病毒液按感染指数 (MOI) 1:3 共同培养 4 h, 加入含 200 mL/L 的 FBS 的 RPMI 1640 培养液继续培养。48 h 后荧光显微镜下观察 GFP 表达情况, 流式细胞仪上机检测表达绿色荧光蛋白的细胞比例计算转染效率。

1.4 实时荧光定量 PCR 检测 *SHIP* 在 K562 细胞表达

收集转染的 K562 细胞, 提取细胞总 RNA 分光光度计测量 260 nm 的吸光度。取 4 μ L 加入试剂盒逆转录, 取 5 μ L 进行定量扩增。*SHIP* 上游引物: 5'-CGA CAA GAA GCT GAG TCC CTT T-3', 下游引物: 5'-GGT AGT TAA GAT CCC CAA ACC AGA A-3', 探针: 5'-FAM-ACA TCA CTC ACC GCT TCA CGC ACC-TAMRA-3'。参数为 93 $^{\circ}$ C 预变性 2 min 1 个循环。93 $^{\circ}$ C 变性 45 s, 55 $^{\circ}$ C 退火 45 s, 共 40 个循环。GENE5700 软件分析结果。实验重复 3 次。

1.5 Western blot 检测转染后各组 K562 细胞内 SHIP 蛋白和 Akt 磷酸化水平

收集不同转染组各 5 \times 10⁶ 个细胞, 用蛋白裂解液裂解细胞后, 离心去细胞碎片, 95 $^{\circ}$ C 10 min 后, 于 100 g/L SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳, 进行蛋

白半定量检测。

1.6 增殖实验

取各组细胞调整密度均为 $5 \times 10^4/\text{mL}$, 接种于 96 孔无菌培养板中, 每孔 200 μL 。每个时段下设 3 个复孔, 实验重复 3 次。以未转染组做为对照, 每日取出一板, 加入四唑氮兰 (MTT) 溶液 10 μL (10 mg/mL), 孵育 4 h 后应用平板离心机 3 000 r/min ($r = 14.7 \text{ cm}$) 离心 10 min 弃上清, 再加入 200 μL 二甲基亚砷 (DMSO) 终止反应, 应用全自动酶标仪测 490 nm 处吸光度 (A)。

1.7 集落形成实验

K562 细胞集落 (CFU) 计数取上述各组细胞 1×10^3 个, 加入含琼脂 (0.03 g/L) 及含 100 mL/L 的 FBS 的 RPMI 1640 中, 接种于 6 孔板内, 每组 3 个孔, 培养 10 d。> 50 个细胞的细胞团定为 1 个集落。

1.8 细胞周期分析

取 1×10^6 细胞用 700 mL/L 冷乙醇 (4 $^{\circ}\text{C}$) 固定 30 min, RNase A 和碘化丙啶染色 60 min (37 $^{\circ}\text{C}$) 后, 进行流式细胞分析。并计算细胞增殖指数 (PI)。实验重复 3 次。

1.9 TUNEL 法鉴定细胞凋亡

按博士德 TUNEL 试剂盒操作步骤检测, 细胞转染 5 d 后涂片后做 TUNEL 检测, 每张切片随机计数 500 个细胞。细胞中有棕黄色颗粒者为阳性细胞, 即凋亡细胞。

1.10 统计学处理

SAS 8.0 统计软件分析处理, 组间比较采用二因素二水平析因设计方差分析 (Factorial ANOVA)。以 $P < 0.05$ 为有统计学意义。

2 结 果

2.1 慢病毒包装、感染及鉴定

转染 48 h 的 293T 细胞和感染慢病毒 48 h 的 K562 细胞, 荧光显微镜下均可观察到较强的 GFP 绿色荧光。将转染 48 ~ 72 h 后的包装细胞反复冻融 3 ~ 4 次离心取上清后再感染 293T 靶细胞 48 h 后, 测定病毒滴度为 $4 \times 10^7 \text{ IU/mL}$ 。荧光显微镜下计数感染阳性细胞达 $(74.6 \pm 5.8)\%$ (图 1)。感染细胞经 FQ-RT-PCR 扩增出 SHIP mRNA 表达明显增强, Western blot 方法检测 K562 细胞中 SHIP 蛋白也呈阳性表达, 而在 K562 细胞和转染空载体的

K562/FIV 细胞中, SHIP 表达始终很低; 上述结果证明慢病毒成功感染 K562 细胞 (图 2)。

2.2 外源性表现 SHIP 基因抑制 IL-3 诱导的 K562 细胞增殖

对各组细胞的生长、形态进行较发现, K562/SHIP 组细胞增殖抑制率明显高于 K562/FIV 组 ($P < 0.01$); 各组以相同浓度的 IL-3 诱导, 结果显示 IL-3+K562/SHIP 组细胞增殖抑制率也明显高于 IL-3-K562/FIV 组 ($P < 0.01$, 图 3)。

2.3 SHIP 对 K562 细胞集落形成的影响

培养 10 d 后, K562/SHIP 组细胞形成集落为 36.7 ± 7.09 , 与 K562/FIV 组 (73.3 ± 7.1) 相比, 对 K562 细胞集落形成具有明显的抑制作用 ($P < 0.01$); IL-3+K562/SHIP 细胞形成集落为 60.3 ± 6.62 , 明显低于 IL-3-K562/FIV 组 ($91.7 \pm 4.2, P < 0.01$)。

2.4 SHIP 对 K562 细胞周期的影响

流式细胞仪分析结果表明 SHIP 基因表达使 K562 细胞 G0/G1 期细胞比例升高, S 期和 G2/M 期细胞比例降低, PI 降低。说明转染 SHIP 基因能使 K562 细胞增殖能力降低 (表 1)。

2.5 TUNEL 法检测细胞凋亡

TUNEL 法检测各组细胞凋亡率结果显示 K562/SHIP 组细胞凋亡率 ($30.6 \pm 9.64\%$) 明显高于 K562/FIV 组 ($8.2 \pm 2.2\%$) 和 K562 组 ($6.6 \pm 2.8\%$), 差异有统计学意义 ($P < 0.05$, 图 4)。

2.6 SHIP 对凋亡酶 caspase-3 表达的影响

转染野生型 SHIP 基因 K562 细胞可出现 pro-caspase-3 蛋白表达量有所减少 (图 5)。

2.7 外源 SHIP 基因抑制 IL-3 介导的 K562 细胞 Akt 活化

在静止期细胞, SHIP 表达导致 Akt 磷酸化水平下降; K562/SHIP 细胞组 Akt 磷酸化水平较 K562/FIV 组下降了 3 倍, 差异有统计学意义 ($F = 56.18, P < 0.01$)。转染后以无血清培养基培养各组细胞 10 h 后, 用 IL-3 刺激各转染组细胞, 检测不同时间点 Akt 磷酸化水平, 发现有外源性 SHIP 蛋白表达组细胞 p-Akt308 和 p-Akt473 水平均增加程度明显低于对照组呈下降趋势, 而 Akt 水平无明显变化; 撤除 IL-3 刺激后, K562/SHIP 组细胞 Akt 磷酸化水平快速下降, 而转染空载体组细胞 Akt 磷酸化水平下降缓慢, 持续时间较长; 提示 SHIP 在生长因子诱导的 Akt 活化过程中起重要的负调控作用 (图 6)。

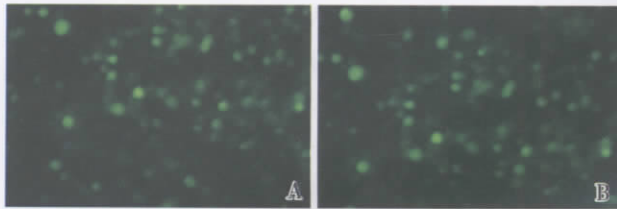


图 1 荧光显微镜观察转染 SHIP 和空载体的 K562 细胞

Fig.1 K562 cells transfected with SHIP and empty vector

Under fluorescence microscope, K562 cells which had been transfected show green color

A: K562/SHIP; B: K562/FIV; × 200

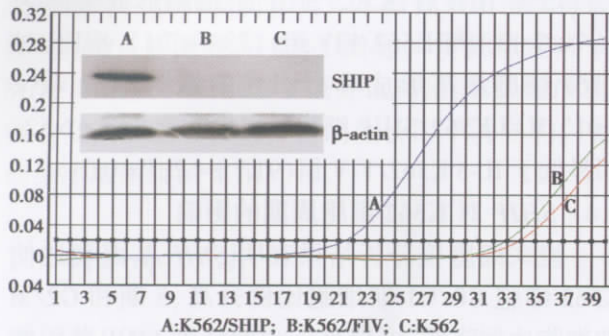


图 2 不同转染组 SHIP 基因和蛋白表达

Fig.2 Detection of SHIP mRNA and SHIP protein in K562 cells transfected with SHIP or not

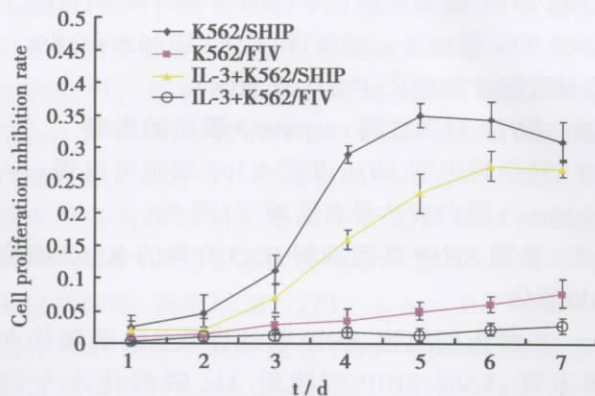


图 3 不同转染组细胞增殖抑制率

Fig.3 Anti-proliferative effect of SHIP on K562 cells in different days

表 1 细胞周期分布及细胞增殖指数

Table 1 The distribution of cell cycle and proliferation index (PI) in K562/SHIP, K562/FIV, and K562 cells

Group	G0/G1 (%)	S (%)	G2/M (%)	PI
K562/SHIP	51.09 ± 8.79 ¹⁾	19.07 ± 2.05	28.84 ± 3.69	0.48 ± 0.03 ¹⁾²⁾
K562/FIV	35.92 ± 4.52 ³⁾	24.41 ± 4.65	39.67 ± 5.51	0.64 ± 0.04 ³⁾
K562	34.42 ± 5.20	25.47 ± 5.46	40.11 ± 5.63	0.66 ± 0.04

1) $P < 0.05$, vs K562/FIV; 2) $P < 0.05$, vs K562; 3) $P > 0.05$, vs K562

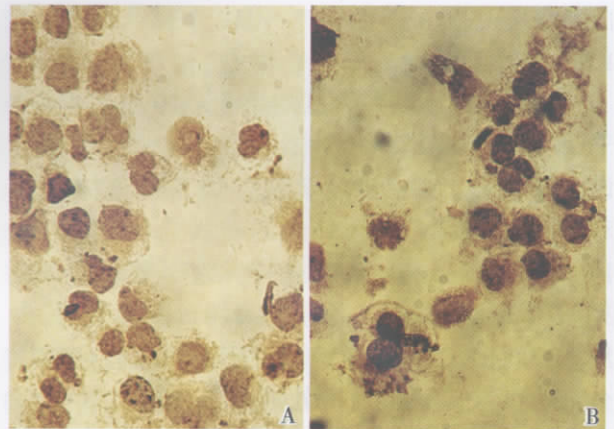


图 4 TUNEL 法比较转染 SHIP 基因和空载体 K562 细胞凋亡情况

Fig.4 Detecting the apoptosis of K562 cells transfected with SHIP or empty vector

A: K562 cells transfected with empty vector; B: K562 cells transfected with SHIP

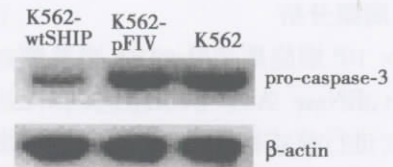


图 5 Western blot 检测各转染组 pro-caspase-3 的表达变化

Fig.5 Comparison of the caspase expression in K562 cells

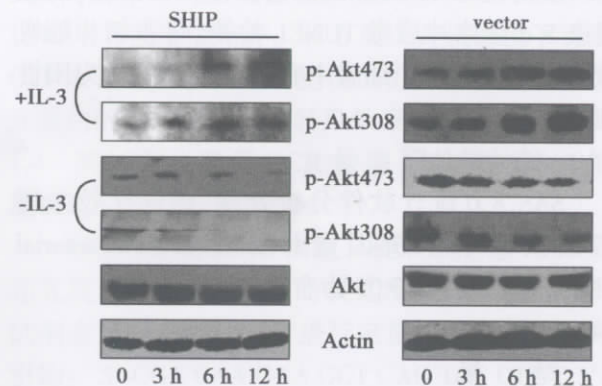


图 6 转染 SHIP 基因抑制 K562 细胞 Akt 磷酸化水平

Fig.6 Akt phosphorylation is inhibited in SHIP expressing cells

3 讨论

SHIP 基因是继 PTEN 之后发现的又一个磷酸肌醇酯磷酸酶(PIPase)。该基因位于染色体 2q36-37.1,仅限于造血细胞特异性表达,在生长因子介导的造血细胞增殖和生存信号传导途径中起关键负性调控作用,而多种细胞因子的促增殖作用是肿瘤发生发展的重要机制。SHIP 的主要功能是特异性清除磷脂酰肌醇 3 激酶(PI3K)代谢产物 PIP3 的 5'磷酸基而使其降解为 PI(3,4)P2,确保 PI3K/Akt 信号通路的下调^[8-9]。罗建民等^[2,3]首次发现在白血病患者存在 SHIP 基因的功能结构域遗传学突变;在这些突变中,78%的突变集中在 SHIP 基因的重要结构域,如 SH2 结构域的 FLVRES 修饰区、PTPase 和 PxxP 功能区;并且 SHIP 基因突变的白血病细胞增殖异常,凋亡受抑;随后张苏江等^[10]也在急性髓系白血病患者中发现两种新的 SHIP 突变(A > T, Q1154L Q1153L)。SHIP 基因在白血病发病中的作用尚不明了。我们前期研究表明, K562 细胞中 bcr/abl 的表达对 SHIP 基因功能有抑制作用,封闭 bcr/abl 能使 K562 细胞 SHIP 蛋白重新表达, Akt 磷酸化水平下调,这些都表明 SHIP 基因在白血病发生发展中发挥着重要作用。

本研究以 SHIP 蛋白表达阴性的白血病细胞系 K562 为研究对象,构建了慢病毒转移质粒,与包装质粒一起构成三质粒慢病毒载体系统,经荧光定量 PCR 方法和 Western blot 法证明转染携带野生型 SHIP 基因慢病毒质粒后 K562 细胞 SHIP 重新表达。通过对转染 SHIP 基因后 K562 细胞的生物学特性观察,发现 K562/SHIP 组细胞和 IL-3+ K562/SHIP 组细胞增殖抑制率均明显上升,倍增时间较 IL-3 诱导及未经 IL-3 诱导的对照组细胞的倍增时间延长;且克隆形成能力明显下降。细胞周期分析发现,转染 SHIP 基因组 G1 期细胞显著增多, G2/M 期细胞明显减少,说明 DNA 合成受到抑制,大多数细胞阻滞于 G1 期。通过 Tunel 法检测凋亡发现,转染 SHIP 组细胞凋亡率明显增加, Western blot 检测发现转染 SHIP 基因导致 K562 细胞 pro-caspase-3 表达减少,因此 SHIP 蛋白具有明显的抗增殖和促凋亡作用。

PI3K/Akt 活化是 K562 细胞增殖的重要细胞内分子机制,蛋白激酶 B(PKB, Akt)处于 PI3K/

Akt 信号转导通路的核心部位,在 PI3K 的作用下发生 2 个位点磷酸化,一个是催化结构域 Thr³⁰⁸ 位点,另一个是调节结构域 Ser⁴⁷³ 位点^[11];以上位点磷酸化后 Akt 被激活,促进白血病细胞增殖^[12]。本研究对 Thr³⁰⁸ 和 Ser⁴⁷³ 位点 Akt 磷酸化水平检测结果显示,野生型 SHIP 基因能显著下调 K562 细胞 Akt308 和 473 磷酸化水平,提示 SHIP 基因表达缺失是 K562 细胞基础 p-Akt 高表达的关键因素之一。

为确定 SHIP 在 IL-3 诱导 K562 细胞增殖中是否同样发挥作用,我们将各组细胞在去除血清的培养基中孵育 10 h 以去除血清的影响,再分别加入相同浓度的 IL-3 诱导,发现不表达 SHIP 基因的 K562/FIV 组和 K562 细胞与 K562/SHIP 组细胞相比, Akt 磷酸化水平增高更明显,磷酸化时间延长,当从培养基中撤除 IL-3 作用后,表达 SHIP 的 K562 细胞中 Akt 磷酸化水平迅速下降,而 K562/FIV 组细胞在撤除 IL-3 12 h 后仍能检测到 p-Akt308 和 473 的较强表达。因此我们认为, SHIP 基因在 IL-3 受体下游的 Akt 活化中发挥关键负调控作用, SHIP 基因可能通过抑制生长因子介导的 Akt 活化而使白血病细胞凋亡增加,生长受抑。

总之,我们的研究证明 SHIP 基因具有重要的抑制增殖和促凋亡功能,并由此推论 SHIP 基因缺失在白血病发病机制中可能具有重要作用。SHIP 基因突变或表达缺失,削弱了对 PI3K/Akt 信号传导通路的负调控作用,导致 K562 细胞中 Akt 激酶的基础磷酸化水平及细胞因子介导的磷酸化水平均上调;这为研究 SHIP 基因在白血病中抑癌作用的分子机制奠定了基础。

参考文献:

- [1] Liu Q, Sasaki T, Kozieradzki I, et al. SHIP is negative regulator of growth factor receptor-mediated PKB/Akt activation and myeloid cell survival [J]. Genes Dev, 1999, 13(8):786-791.
- [2] Luo JM, Yoshida H, Komura S, et al. Possible dominant-negative mutation of the SHIP gene in acute myeloid leukemia [J]. Leukemia, 2003, 17(5):1-8.
- [3] 罗建民,刘泽林,郝红领,等.急性白血病细胞 SHIP 基因的突变分析 [J].中华血液学杂志, 2004, 25(7): 385-388
- [4] 刘晓军,罗建民,杨琳,等.慢性粒细胞白血病中

- SHIP* 基因的表达变化及机制探讨 [J]. 解放军医学杂志, 2007, 33(6):701-703
- [5] 任金海, 罗建民, 杨敬慈, 等. 白血病细胞内 *SHIP* 基因表达及其对 AKT 磷酸化的影响 [J]. 中华血液学杂志, 2007, 28(12):844-845.
- [6] Aggerholm A, Gronbaek K, Guldborg P, et al. Mutational analysis of the tumor suppressor gene *MMAC1/PTEN* in malignant myeloid disorders [J]. *Eur J Haematol*, 2000, 65(8):109-113.
- [7] Yang J, Liu J, Zheng J, et al. A reappraisal by quantitative flow cytometry analysis of *PTEN* expression in acute leukemia [J]. *Leukemia*, 2007, 102(8):972-980.
- [8] Helgason CD, Antonchuk J, Bodner C, et al. Homeostasis and regeneration of the hematopoietic stem cell pool are altered in *SHIP*-deficient mice [J]. *Blood*, 2003, 102(7):3541-3547.
- [9] Kisseleva MV, Cao L, Majerus PW, et al. Phosphoinositide-specific inositol polyphosphate 5-phosphatase inhibits Akt/protein kinase B phosphorylation and leads to apoptotic cell death [J]. *J Biol Chem*, 2002, 277(7):6266-6272.
- [10] 张苏江, 李建勇, 施静艺, 等. 急性髓系白血病患者 *PDGFβ* 和 *SHIP* 基因突变及其单核苷酸多态性研究 [J]. 中华血液学杂志, 2006, 27(6):383-385.
- [11] Persad S, Attwell S, Gray V, et al. Regulation of protein kinase B/Akt-serine473 phosphorylation by integrin-linked kinase: critical roles kinase activity and amino acids arginine 211 and serine 343 [J]. *J Biol Chem*, 2001, 276(8):27462-27469.
- [12] Xu Q, Simpson SE, Scialla TJ, et al. Survival of acute myeloid leukemia cells requires PI3 kinase activation [J]. *Blood*, 2003, 102(8):972-980.

(编辑 孙慧兰)

(上接第 254 页 from page 254)

- 实验研究 [J]. 中山大学学报:医学科学版, 2007, 28(3S):31-34.
- [3] Roth S, Michel K, Gressner AM. Transforming growth factor beta in liver parenchymal cells, its injury-dependent release and paracrine effects on rat hepatic stellate cells [J]. *Hepatology*, 1998, 27(4):1003-1012.
- [4] 潘志恒, 谢瑶, 何宏文, 等. 大黄蛰虫丸对大鼠肝星状细胞活化及增殖的影响 [J]. 中国中西医结合杂志 2004(基础理论研究特集), 6(24):117-119.
- [5] 孙克伟, 诸裕义, 陈翔, 等. 大黄蛰虫丸抗免疫性肝纤维化研究 [J]. 中西医结合肝病杂志, 1997, 7(2):90-92.
- [6] 石军, 任万华, 郝菁华, 等. 大鼠肝星形细胞、枯否细胞的同步分离培养与鉴定 [J]. 山东大学学报:医学版, 2005, 43(11):1079-1082.
- [7] 张霄翔, 杨雁, 吴强, 等. 不同时间收集的 KCCM 对 HSC-T6 细胞的增殖和胶原合成的影响 [J]. 中国药理学杂志, 2004, 39(2):110-111.
- [8] Gressner AM, Weiskirchen R. Modern pathogenetic concepts of liver fibrosis suggest stellate cells and TGF- β as major players and therapeutic targets [J]. *J Cell Mol Med*, 2006, 10(1):76-99.
- [9] 崔速南, 汪明明, 王灿. 细胞因子与肝纤维化 [J]. 新医学, 2005, 36(10):613-614.
- [10] 吴琳石, 邱江锋, 吴志勇. 肝纤维化时星状细胞活化的分子生物学机制 [J]. 肝胆胰外科杂志, 2006, 18(1):58-60.
- [11] 朱彩平, 袁冬生. 中药复方治疗肝纤维化的研究进展 [J]. 热带医学杂志, 2008, 8(07):748-750.
- [12] 潘志恒, 谢瑶, 何宏文, 等. 大黄蛰虫丸对大鼠肝星状细胞基质金属蛋白酶基因表达的影响 [J]. 中国中西医结合杂志, 2005, 25(12):1100-1103.
- [13] 刘平. 肝纤维化的防治 [J]. 中华肝脏病杂志, 2000, 8(4):242.
- [14] Liu C, Jiang CM, Liu CH, et al. Effect of Fuzhenghuayu decoction on vascular endothelial growth factor secretion in hepatic stellate cells [J]. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int*, 2002, 1(2):207-210.
- [15] 周正, 刘丽萍, 张赤志, 等. 抗纤软肝冲剂对肝星状细胞自分泌转化生长因子 β_1 的影响 [J]. 中国中医药信息杂志, 2003, 10(9):21-22.

(编辑 孙慧兰)