

## 细胞调控因子 SKP2 的表达与 HL-60/A 耐药的关系

肖洁, 尹松梅\*, 谢双锋, 聂大年, 李益清, 马丽萍, 王秀菊, 冯坚红  
(中山大学第二附属医院血液内科, 广东 广州 510120)

**摘要:** 【目的】观察细胞周期调控因子 SKP2、P27<sup>kip1</sup> 在白血病耐药细胞株 HL-60/A 和非耐药细胞株 HL-60 细胞中的表达及细胞周期比例,探讨细胞增殖与耐药的关系。【方法】RT-PCR、Western blot 检测 SKP2、P27<sup>kip1</sup>、MRP mRNA 及蛋白表达,流式细胞仪检测细胞周期,采用药物毒性分析方法检测细胞对化疗药物的敏感性。【结果】白血病耐药细胞株 HL-60/A 对阿霉素、柔红霉素、阿糖胞苷的耐药倍数分别为 49.14 倍、39.20 倍和 6.43 倍;HL-60/A 细胞 MRP 的表达高于 HL-60;HL-60/A 和 HL-60 细胞株 G0/G1 细胞期比例分别为 (35.10 ± 0.81)% 和 (43.96 ± 1.12)%, 两组比较  $P < 0.05$ ;HL-60/A 细胞中 SKP2 的表达高于 HL-60 细胞;P27<sup>kip1</sup> 的表达低于 HL-60 细胞。【结论】HL-60/A 细胞多药耐药机制产生与 MRP 的表达增高有关。耐药 HL-60/A 处于增殖期的细胞比例高,具有更高的增殖活性。

**关键词:** 细胞周期; S 期激酶蛋白 2; 多药耐药相关蛋白; 白血病

**中图分类号:** R733.7      **文献标识码:** A      **文章编号:** 1672-3554(2009)02-0137-05

### Relationship between Expression of Cell Regulatory Factor SKP2 and Drug Resistance of HL-60/A Cells

XIAO Jie, YIN Song-mei\*, XIE Shuang-feng, NIE Da-nian, LI Yi-qing, MA Li-ping,  
WANG Xiu-ju, FENG Jian-hong

(Department of Hematology, The Second Affiliated Hospital, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510120, China)

**Abstract:** 【Objective】To observe the proportion of cell cycle and the expression of cell cycle regulators S-phase kinase-associated protein 2 (SKP2) and P27<sup>kip1</sup> in drug-resistant leukemia cell line HL-60/A and drug non-resistant cell line HL-60, and to investigate the relationship between proliferation and multi-drug resistance of leukemia cells. 【Methods】The expression of SKP2, P27<sup>kip1</sup>, and multi-drug resistance associated protein (MRP) mRNA were determined by RT-PCR and Western blot analysis. The cell cycle was analyzed by flow cytometry. Drug toxicity analysis was used to determine the sensitivity of the cells to chemotherapeutic drugs. 【Results】Drug-resistant leukemia cell line HL-60/A showed 49.14-fold resistance to Adriamycin, 39.20-fold resistance to Daunorubicin, and 6.43-fold resistance to Arabinosylcytosine, respectively. MRP expression of HL-60/A cell was higher than that of HL-60 cell. The proportions of HL-60/A cells and HL-60 cells in the G0/G1 phase of the cell cycle were (35.10 ± 0.81)% and (43.96 ± 1.12)%, respectively ( $P < 0.05$ ). The expression of SKP2 was significantly higher in HL-60/A cells than that in HL-60 cells, but the expression of P27<sup>kip1</sup> in HL-60/A cells was lower. 【Conclusions】The mechanism of multi-drug resistance of HL-60/A cell line is related to up-regulated expression of MRP. The proportion of drug resistant cell line HL-60/A at the proliferation stage is high which indicates that drug-resistant cells have higher proliferative activity.

**Key words:** cell cycle; S-phase kinase-associated protein 2; multi-drug resistance-associated protein; leukemia

[J SUN Yat-sen Univ (Med Sci), 2009, 30(2): 137-141]

白血病是常见的恶性血液肿瘤之一。目前,联合化疗是治疗急性白血病(acute leukemia, AL)的主要方法,但大约有 20% ~ 30% 的初治的 AL 患者始终不能缓解,有 60% ~ 70% 的患者完全缓解

后复发。治疗失败的原因主要是白血病细胞对化疗药物原发或继发耐药<sup>[1-2]</sup>。为提高白血病的治愈率,提高白血病患者的无病生存期,要求研发新的治疗方法及化疗增敏剂。基因治疗作为疾病治疗

收稿时间:2008-10-14

基金项目:广东省自然科学基金(06021324)、广州市科技计划项目(2006J1-C0071)

作者简介:肖洁,硕士,住院医师; \* 通讯作者:尹松梅,教授, E-mail: yinsongmei@21cn.com

的一种新手段,越来越受到人们的关注。本文从细胞周期调节与细胞耐药的关系着手,对敏感细胞株 HL-60 和耐药细胞株 HL-60/A 的细胞周期调控因子 SKP2、P27<sup>kip1</sup> 进行检测,探讨 SKP2、P27<sup>kip1</sup> 在白血病细胞中的表达与耐药的关系。为有效治疗白血病提供理论依据。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

1.1.1 细胞来源与细胞培养 HL-60 细胞,中山大学药学院引进,培养在含 100 mL/L 胎牛血清(杭州四季青公司)、30 g/L 谷氨酰胺,100 IU/mL 青霉素,100 μg/mL 链霉素的 RPMI1640 培养基(美国 Gibco),置放于体积分数 5% CO<sub>2</sub>、37 °C 恒温培养箱,隔 2 天传代 1 次。HL-60/A 细胞购于中国协和医科大学血液病研究所。培养条件同上。

1.1.2 试剂与抗体单抗 小鼠抗人 P27<sup>kip1</sup> 单抗(IgG 型)(美国 R&D system 公司);小鼠抗人 MRP(multi-drug resistance associated protein, MRP)单抗(IgG 型)(美国 CHEMICON 公司);小鼠抗人 SKP2 单抗(IgG 型)(美国 Zymed Laboratories 公司);小鼠抗人 GAPDH 单抗(IgG 型)(美国 CHEMICON 公司);HRP 标记的兔抗鼠 IgG 单抗(武汉博士德生物工程有限公司);MMuLV 逆转录酶、Taq DNA 酶(美国 MBI 公司),琼脂糖(西班牙 Biowest 公司);Phototope-HRP detection kit(美国 cell signaling);Cell counting kit-8(日本 同仁化学研究所);阿糖胞苷(比利时 法玛西亚普强公司);阿霉素(中国深圳万乐制药有限公司);柔红霉素(中国深圳万乐制药有限公司)。

### 1.2 方 法

1.2.1 细胞毒性分析 收集对数生长期的 HL-60、HL-60/A 细胞,1 000 r/min( $r = 10$  cm)离心 5 min,去上清,再以完全培养基重悬,计数细胞,取 96 孔板,每孔接种  $1 \times 10^5$  细胞,体积 100 μL,每孔加入不同药物浓度的阿霉素、柔红霉素、阿糖胞苷。孵育 24 h 后加入 37 °C 预热的 CCK-8,在培养箱中继续孵育 4 h,在 450 nm 处测吸光光度。每次同一条件做 6 个平行孔,重复 4 次。

1.2.2 细胞周期分布 收集对数生长期的 HL-60、HL-60/A 细胞,PBS 洗涤 2 次,用 PBS 液重悬细胞,调整细胞密度为  $1 \times 10^6$ /mL,取 0.5 mL 细

胞悬液,加入 2 mL 700 mL/L 冰乙醇 4 °C 过夜,2 000 r/min( $r = 10$  cm)离心 5 min,弃上清,用 PBS 洗涤 2 次,加入 50 mg/L RNA 酶 50 μL,50 mg/L 碘化丙啶(propidium iodide, PI) 450 μL,37 °C 避光 1 h,流式细胞仪检测细胞周期。

1.2.3 RT-PCR 引物的设计与合成 SKP2、P27<sup>kip1</sup>、MRP、β-actin 引物以 primer premier 5.0 软件设计生成。SKP2 上游引物:5'-GCC CCA ATC TTG TCC ATC TA-3',下游引物:5'-CTG CGA TTC CAA AAA CT-3',扩增产物为 192 bp; P27<sup>kip1</sup> 上游引物:5'-CTT TTC ACT TCG GGC TGT GT-3',下游引物:5'-CAC AAA ACA TGC CAC TTT GG-3',扩增产物为 368 bp;MRP 上游引物为:5'-CTT CGT TCT CAG GCA CAT CA-3',下游引物:5'-GCC TCA TCC AAC ACA AGG AT-3',扩增产物为 447 bp;β-actin 上游引物:5'-GTC CAC CTT CCA GCA GAT GT-3',下游引物:5'-CAC CTT CAC CGT TCC AGT TT-3',扩增产物为 245 bp。由上海生工合成。

1.2.4 RT-PCR 检测细胞的 SKP2、P27<sup>kip1</sup>、MRP、β-actin mRNA 的表达 收集对数生长期的 HL-60、HL-60/A 细胞,PBS 洗涤 2 次,用 trizol 核酸提取试剂盒(invitrogen 公司)抽提细胞总 RNA,紫外分光光度计测定 RNA 纯度(A260/A280 > 1.8),并计算其含量,用去 RNA 酶去离子水调整 RNA 至浓度为 0.5 μg/μL。取 10 μL 总 RNA,加入多聚寡核苷酸 1 μL,调整总体积为 12 μL,混匀后 70 °C 反应 5 min,置于冰上。加入 5 × 反应缓冲液 4 μL,RNA 酶抑制剂(20 U/μL) 1 μL,10 mmol dNTP 2 μL,离心后 37 °C 孵育 5 min。加入 M-MuLV 酶(200 U/μL) 1 μL,最后总体积为 20 μL,42 °C 孵育 60 min,70 °C 条件下孵育 10 min,终止反应,置于冰上冷却。cDNA 合成后保存于 -20 °C 冰箱。PCR 反应取 2 μL 逆转录产物,分别加入 10 × 缓冲液 5 μL,10 mmol dNTP 1 μL,MgCl<sub>2</sub> 3 μL,上游引物(20 μmol/L) 2.5 μL,下游引物(20 μmol/L) 2.5 μL,Taq DNA 酶(1 U/μL) 1.5 μL,无菌双蒸水 32.5 μL,总反应体系 50 μL。SKP2 扩增条件为 95 °C 30 s 预变性,94 °C 30 s 变性,54 °C 30 s 退火,72 °C 1 min 延伸,共 30 个循环。P27<sup>kip1</sup> 的扩增条件为 95 °C 30 s 预变性,94 °C 30 s 变性,54 °C 30 s 退火,72 °C 1 min 延伸,共 30 个循环。MRP 扩增条件为 95 °C 30 s 预变性,94 °C 30 s 变性,55.5 °C

30 s 退火,72 °C 1 min 延伸,共 30 个循环。 $\beta$ -actin 扩增条件为 95 °C 30 s 预变性,94 °C 30 s 变性,55 °C 30 s 退火,72 °C 1 min 延伸,共 30 个循环。以上 PCR 产物经 20 g/L 琼脂糖凝胶电泳,在凝胶成像仪上观察结果并摄相。

1.2.5 Western-blot 方法检测细胞中 SKP2、P27<sup>kip1</sup>、MRP、GAPDH 蛋白的表达 收集对数生长期的 HL-60、HL-60/A 细胞,PBS 洗涤 2 次,取 RIPA 裂解液(强),并在临用前加入 PMSF,使其终浓度为 1 mmol/L。每  $1 \times 10^6$  细胞中加入 200  $\mu$ L 细胞裂解液,冰上充分裂解,100 °C 水浴中反应 15 min,4 °C、12 000 g 离心 15 min,上清液保存于 -80 °C 冰箱中备用。取部分上清液用 BCA 法测定蛋白浓度,并调节各组蛋白浓度。取上清加入  $5 \times$  上样缓冲液煮沸 5 min 备用,采用 SDS-PAGE 电泳,SKP2、P27<sup>kip1</sup>、 $\beta$ -actin 蛋白电泳的分离胶浓度为 12%,MRP 的分离胶浓度为 6%,垂直电泳条件为 45 min,200 V。SKP2、P27<sup>kip1</sup>、GAPDH 蛋白的电转条件为 90 min,100 V,MRP 的电转条件为 180 min,80 V。取出电转后的 PVDF 膜,TBS/T 冲洗两次后封闭液室温封闭 1 h。封闭后 TBS/T 洗 3 次,加入一抗,4 °C 摇床过夜,TBS/T 洗 3 次,加入二抗室温孵育 2 h,TBS/T 洗 3 次,进行蛋白的检测及图象分析。将膜上的液体控干,置于平皿中,加入 10 mL 发光液 LumiGLO,反应 1 min。暗室中曝光 X 线片 1 ~ 3 min,显影 30 ~ 60 min,定影 10 min。清水冲洗后晾干。

### 1.3 统计分析

计量资料的描述用均数  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ),两独立样本均数的比较用  $t$  检验,检验水准定为  $P < 0.05$  有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 HL-60/A 细胞具有多药耐药性

ADR 对 HL-60 细胞的半数抑制浓度 (Inhibitory concentration 50, IC<sub>50</sub>) 是 0.044  $\mu$ g/mL,对 HL-60/A 细胞的 IC<sub>50</sub> 是 2.162  $\mu$ g/mL,耐药倍数 49.14 倍。DNR 对 HL-60 细胞的 IC<sub>50</sub> 是 0.035  $\mu$ g/mL,对 HL-60/A 细胞的 IC<sub>50</sub> 是 1.388  $\mu$ g/mL,耐药倍数 39.20 倍。Ara-C 对 HL-60 细胞的 IC<sub>50</sub> 是 0.04  $\mu$ g/mL,对 HL-60/A 细胞的 IC<sub>50</sub> 是 0.24  $\mu$ g/mL,耐药倍数 6.43 倍(图 1)。

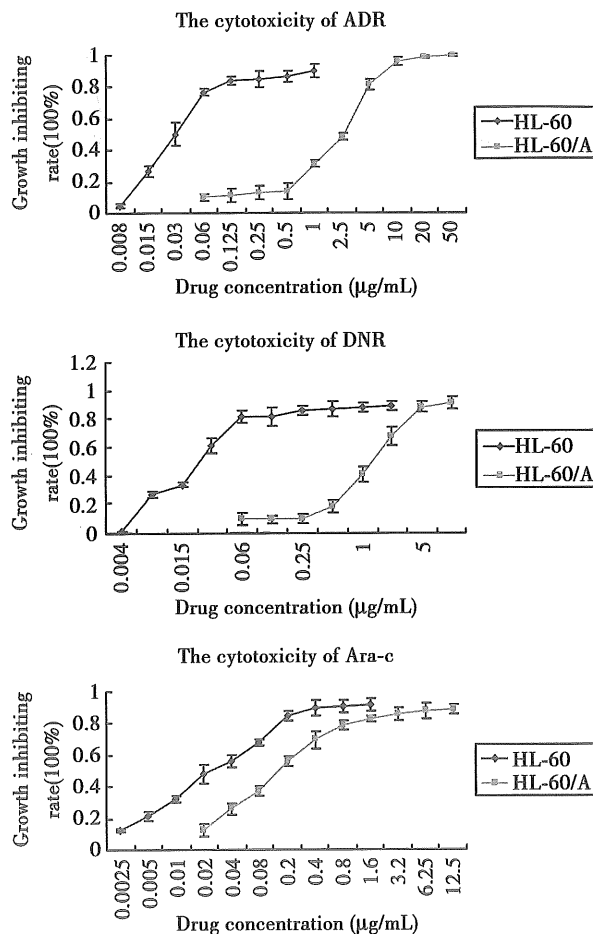


图 1 HL-60 和 HL-60/A 细胞对 DNR、ADR、Ara-c 的药物敏感性曲线

Fig.1 Drug sensitivity curves of HL-60 and HL-60/A cells to DNR, ADR, and Ara-c at different drug concentration ( $n = 4$ )

### 2.2 HL-60/A 细胞中 MRP 的表达高于 HL-60 细胞

RT-PCR 检测 HL-60 和 HL-60/A 细胞 MRP mRNA 的表达,与内参  $\beta$ -actin 的比值表示表达量。HL-60 和 HL-60/A 细胞 MRP mRNA 的表达分别为  $(0.34 \pm 0.12)\%$  和  $(0.60 \pm 0.07)\%$ ,差异有统计学意义 ( $t = -4.4, P = 0.004$ ,图 2)。Western blot 检测细胞 MRP 蛋白的表达,与内参 GAPDH 的比值表示表达量。MRP 蛋白的表达分别为  $(0.20 \pm 0.02)\%$  和  $(0.60 \pm 0.04)\%$ ,两者比较差异有统计学意义 ( $t = -16.4, P = 0.000$ ,图 3)。

### 2.3 HL-60/A 细胞 SKP2 的表达高,P27<sup>kip1</sup> 的表达低

RT-PCR 检测 HL-60 和 HL-60/A 细胞 SKP2、P27<sup>kip1</sup> mRNA 的表达,与内参  $\beta$ -actin 的比值表示

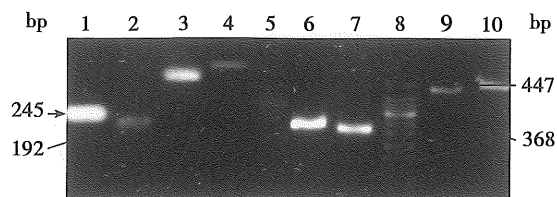


图 2 HL-60 和 HL-60/A 细胞中 SKP2、P27<sup>kip1</sup>、MRP mRNA 的表达情况

Fig.2 SKP2, P27<sup>kip1</sup>, and MRP mRNA expression in HL60 and HL-60/A cells

A: HL-60 cell; B: HL-60/A cell

Lane 5,8: marker; Lane 4,10: MRP; Lane 3,9: P27<sup>kip1</sup>; Lane 2,7: SKP2; Lane 1,6:  $\beta$ -actin

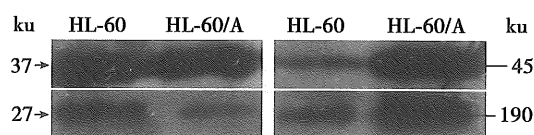


图 3 HL-60 和 HL-60/A 细胞中 SKP2、P27<sup>kip1</sup>、MRP 蛋白的表达

Fig.3 Protein expression of SKP2, P27<sup>kip1</sup>, and MRP in HL-60 and HL-60/A cells

A: GAPDH protein; B: SKP2 protein; C: P27<sup>kip1</sup> protein; D: MRP protein

表达量。HL60 和 HL-60/A 细胞中 SKP2 mRNA

的表达水平分别为  $(0.52 \pm 0.01)\%$  和  $(0.83 \pm 0.03)\%$ , 差异有统计学意义 ( $t = -19.1, P = 0.000$ )。P27<sup>kip1</sup> mRNA 的表达分别为  $(0.75 \pm 0.04)\%$  和  $(0.41 \pm 0.05)\%$ , 差异有统计学意义 ( $t = 11.8, P = 0.000$ , 图 2) Western blot 检测 HL60 和 HL-60/A 细胞 SKP2、P27<sup>kip1</sup> 蛋白的表达, 与内参 GAPDH 的比值表示表达量。HL60 和 HL-60/A 细胞 SKP2 蛋白的表达分别为  $(0.27 \pm 0.045)\%$  和  $(0.58 \pm 0.06)\%$ , 两者比较差异有统计学意义, ( $t = -7.4, P = 0.002$ ); P27<sup>kip1</sup> 蛋白的表达分别为  $(0.63 \pm 0.13)\%$  和  $(0.30 \pm 0.13)\%$ , 两者比较差异有统计学意义 ( $t = 3.1, P = 0.037$ , 图 3)

#### 2.4 HL-60/A 细胞株处于 G1 期细胞比例高

用流式细胞仪检测 HL-60 和 HL-60/A 两组细胞周期的分布。G0/G1 期分别为:  $(43.96 \pm 1.12)\%$ 、 $(35.10 \pm 0.81)\%$ , 差异有统计学意义 ( $t = 11.1, P = 0.001$ )。S 期分别为:  $(49.85 \pm 0.91)\%$ 、 $(55.56 \pm 0.95)\%$ , 差异有统计学意义 ( $t = -7.5, P = 0.002$ )。G2-M 期分别为:  $(6.19 \pm 1.52)\%$ 、 $(9.34 \pm 0.25)\%$ , 差异有统计学意义 ( $t = -3.5, P = 0.066$ )。耐药细胞处于增殖周期中 S 期及 G2-M 期的比例高于敏感细胞(图 4)。

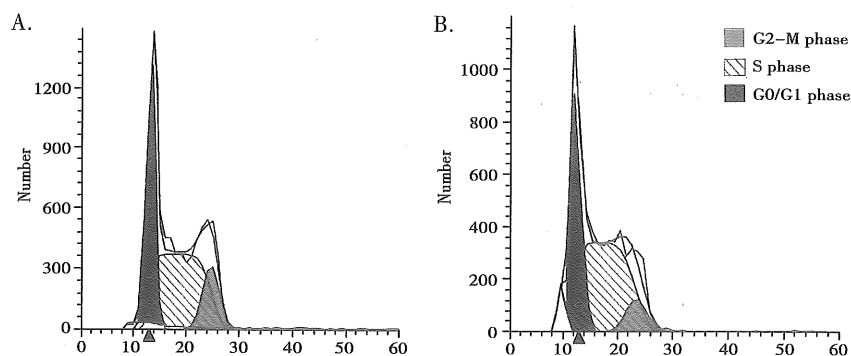


图 4 流式细胞仪检测各组细胞细胞周期

Fig.4 Determination of Cell cycles of the different cells by flow cytometry

A: HL-60 cells; B: HL-60/A cells

### 3 讨论

白血病耐药发生的机制与多药耐药基因 (multi-drug resistance, MRD) 的表达有关。多药耐药相关蛋白 (multi-drug resistance associated protein, MRP) 是一种分子量为 190 ku 的膜糖蛋白, 隶属于 ATP 结合盒式载体 (ATP-binding cassette, ABC) 超家族蛋白质<sup>[3]</sup>。Wada 等<sup>[4]</sup>通过药物浓度梯

度压力递增培养法, 在含阿霉素培养基中传代培养的 HL-60/DOX 细胞对阿霉素、吡柔比星、长春新碱、足叶乙甙有交叉耐药, 并证明 HL-60/DOX 多药耐药的发生与 MRP 的表达有关, HL-60/DOX 细胞对阿霉素的外排作用增强。本实验中的 HL-60/A 细胞购于天津中国协和医科大学血液病研究所。经药物浓度梯度压力递增法培养, 通过药物毒性分析表明, HL-60/A 具有多药耐药性, 对阿霉素、柔红霉素、阿糖胞苷的耐药倍数分别是 49.14、39.20、6.43

倍,经 RT-PCR 和 Western blot 检测 HL-60/A 细胞中 MRP 的表达明显高于 HL-60 细胞。证明细胞的多药耐药性确与多药耐药相关蛋白 MRP 的表达相关,本研究的结果与 Wada 等的结果一致。

正常哺乳动物细胞在内外因子的调节下有序的循着细胞周期,不断分裂增生及凋亡,保持动态平衡。肿瘤细胞的增殖平衡失调,细胞出现无限制的增殖和凋亡减慢。细胞失控性增生与肿瘤的发生发展有重要的意义。国内有作者对耐药的 A549/DDP 细胞与非耐药的 A549 细胞进行对比研究发现:A549/DDP 细胞处于细胞周期 G1 期的细胞比例明显低于 A549 细胞,耐药细胞的增殖能力增强<sup>[5]</sup>。在本实验中,耐药细胞 HL-60/A 较 HL-60 而言,处在 G0/G1 期的细胞比例减少,而 S 期、G2-M 期的细胞比例高,证明 HL-60/A 的增殖周期更短,增殖能力高于 HL-60。

细胞的增殖依赖于细胞周期正负调控因子的调控。S 期激酶相关蛋白 2 (S-phase kinase-associated protein 2, SKP2) 是一个与细胞周期调控密切相关的基因,参与细胞周期调控因子的蛋白泛素化过程<sup>[6]</sup>。其中,P27<sup>kip1</sup> 是 SKP2 最常见的底物之一<sup>[7]</sup>。P27<sup>kip1</sup> 是一个相对分子质量为 27 KD 的热稳定性蛋白,主要对细胞周期进程起负调控作用,阻滞细胞于 G0/G1 期,阻止细胞进入 S 期。Agarwal A<sup>[8]</sup> 等体内研究证明 SKP2 的高表达促进肿瘤的生成,而抑制 SKP2 的表达,稳定胞核内 P27<sup>kip1</sup> 水平有利于肿瘤的治疗。有研究表明,在一些恶性实体肿瘤,P27<sup>kip1</sup> 的表达与 SKP2 呈负相关,并认为二者是患者独立的预后因素,可能成为新的分子治疗靶点<sup>[9]</sup>。在白血病的研究中也得到同样的结果。Yokozawa 等<sup>[10]</sup> 发现 P27<sup>kip1</sup> 高表达的 AL 患者的无病生存率明显高于 P27<sup>kip1</sup> 低表达的患者。提示 P27<sup>kip1</sup> 是独立的预后因素。Min 等人<sup>[11]</sup> 研究发现 SKP2 的表达与急性非淋巴细胞白血病不良的细胞遗传学特性有关,SKP2 高表达患者无病生存时间短,完全缓解率低。我们对白血病 HL-60 和 HL-60/A 进行检测,发现白血病 HL-60 的 SKP2 的表达显著低于 HL-60/A,而前者的 P27<sup>kip1</sup> 显著高于后者,与国外的研究结果一致。

在本实验中,我们通过 RT-PCR 和 Western blot 方法检测 HL-60 和 HL-60/A 细胞中 SKP2、P27<sup>kip1</sup> 的表达发现:药物敏感性高的白血病细胞癌基因 SKP2 的水平低,抑癌基因 P27<sup>kip1</sup> 的表达水平

高;对化疗不敏感的白血病细胞 SKP2、P27<sup>kip1</sup> 的表达结果相反。SKP2 的表达可能是影响白血病耐药的潜在因素,SKP2 有望成为一种白血病基因治疗新靶点。实验中我们还观察到 HL-60/A 处于增殖周期 S 期及 G2-M 期比例增多,说明 HL-60/A 不仅对化疗药物不敏感,而且具有更强的增殖能力,使白血病患者难以达到完全缓解。

#### 参考文献:

- [1] Kim DH, Lee NY, Sung WJ, et al. Multidrug resistance as a potential prognostic indicator in acute myeloid leukemia with normal karyotypes [J]. *Acta Haematol*, 2005, 114(2):78-83.
- [2] Del Poeta G, Stasi R, Aronica G, et al. Clinical relevance of P-glycoprotein expression in de novo acute myeloid leukemia [J]. *Blood*, 1996, 87(5):1997-2004.
- [3] Kruh GD, Chan A, Myers K, et al. Expression complementary DNA library transfer establishes mrp as a multidrug resistance gene [J]. *Cancer Res*, 1994, 54(7):1649-1652.
- [4] Wada H, Saikawa Y, Niida Y, et al. Selectively induced high MRP gene expression in multidrug-resistant human HL60 leukemia cells [J]. *Exp Hematol*, 1999, 27(1):99-109.
- [5] 梁兴杰,黄振华,路艳蒙,等. 肺腺癌 A549/DDP 细胞周期变化及其多药耐药性 [J]. *生物化学与生物物理进展*, 2000, 27(6):616-620.
- [6] Schulman BA, Carrano AC, Jeffrey PD, et al. Insights into SCF ubiquitin ligases from the structure of the skp1-skp2 complex [J]. *Nature*, 2000, 408(6810):381-386.
- [7] Sutterluty H, Chatelain E, Marti A, et al. p45SKP2 promotes p27Kip1 degradation and induces S phase in quiescent cells [J]. *Nat Cell Biol*, 1999, 1(4):207-214.
- [8] Agarwal A, Bumm TG, Corbin AS, et al. Absence of SKP2 expression attenuates BCR-ABL-induced myeloproliferative disease [J]. *Blood*, 2008, 112(5):1960-1970.
- [9] Kataqiri Y, Hozumi Y, Kondo S. Knockdown of Skp2 by siRNA inhibits melanoma cell growth in vitro and in vivo [J]. *J Dermatol Sci*, 2006, 42(3):215-224.
- [10] Yokozawa T, Towatari M, Iida H, et al. Prognostic significance of the cell cycle inhibitor p27<sup>kip1</sup> in acute myeloid leukemia [J]. *Leukemia*, 2000, 14(1):28-33.
- [11] Min YH, Cheong JW, Lee MH, et al. Elevated S-phase kinase-associated protein 2 protein expression in acute myelogenous leukemia: its association with constitutive phosphorylation [J]. *Clin Cancer Res*, 2004, 10(15):5123-5130.