

干扰素、5-AZA-CdR 对白血病细胞 HL-60 和 K562 的作用

黄云燕, 夏焱, 郭海霞, 李文益

(中山大学附属第二医院儿科, 广东 广州 510120)

摘要: 【目的】探讨细胞因子干扰素 (INF) 和甲基化抑制剂 5-杂氮脱氧胞嘧啶核苷 (5-AZA-CdR) 对白血病细胞 HL-60 和 K562 的作用机制。【方法】1 000 U/mL INF 和不同剂量的 5-AZA-CdR 作用于 HL-60 和 K562 48 h, 通过 RT-PCR 检测 Xaf1 和 XIAP mRNA 的表达, 流式细胞技术检测 Bcl-2 家族成员、线粒体膜电位 (ψ_m) 和细胞凋亡的情况。【结果】INF 和 5-AZA-CdR 使 HL-60 和 K562 Xaf1 mRNA 表达增加, 且与 5-AZA-CdR 呈剂量依赖性, 其中 5-AZA-CdR (5 μ mol/L) 的作用最明显; XIAP mRNA 表达无变化。INF 使 HL-60 和 K562 Bax 表达增加, Bcl-2 和 Bcl-xl 表达无改变; 5-AZA-CdR 降低 HL-60 Bcl-2、Bcl-xl、Bax 表达, 增加 K562 Bax 表达, 不影响 K562 Bcl-2 和 Bcl-xl。INF 和 5-AZA-CdR 都能使线粒体膜电位降低、细胞凋亡增加。除细胞凋亡外 INF 和 5-AZA-CdR 对 HL-60 和 K562 的 Xaf1 mRNA、Bcl-2 家族成员以及 ψ_m 无协同作用。【结论】INF 和 5-AZA-CdR 促进 HL-60 和 K562 细胞凋亡, 其作用机制可能与上调 Xaf1 mRNA 的表达, 下调 Bcl-2(Bcl-xl)/Bax 和降低线粒体膜电位有关。

关键词: 白血病, 髓样; 干扰素刺激基因; 5-杂氮脱氧胞嘧啶核苷; 甲基化; Xaf1

中图分类号: R363.1

文献标识码: A

文章编号: 1672-3554(2007)03-0274-05

Effect of γ -interferon and 5-aza-2-deoxycytidine on Leukemia Cells HL-60 and K562

HUANG Yun-yan, XIA Yan, GUO Hai-xia, LI Wen-yi

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

Abstract: 【Objective】To study the effect of cytokines interferon (γ -INF) and 5-aza-2-deoxycytidine (5-AZA-CdR) on leukemia cells HL-60 and K562. 【Methods】1 000 U/mL INF and different doses of 5-AZA-CdR were used for HL-60 and K562 for 48 hours. Then the mRNA expressions of Xaf1 and XIAP were measured by RT-PCR, and the members of the Bcl-2 family, mitochondrial transmembrane potential (ψ_m) and apoptosis were detected by flow cytometry. 【Results】By INF and 5-AZA-CdR the mRNA expression of Xaf1 in HL-60 and K562 were increased, and they displayed dose-dependence with 5-AZA-CdR and the effect of 5 μ mol/L of 5-AZA-CdR was the most distinct, while the ones of XIAP were unchanged. By INF only the expression of Bax in HL-60 and K562 were increased, and ones of Bcl-2 and Bcl-xl unchanged. By 5-AZA-CdR the expression of Bcl-2, Bcl-xl, and Bax only in HL-60 were decreased, but in K562 ones of Bax augmented and ones of Bcl-2 and Bcl-xl unaffected. Both INF and 5-AZA-CdR could reduce ψ_m and promote apoptosis. Besides apoptosis, they did not have synergetic effect on the mRNA expression of Xaf1, the members of the Bcl-2 family and ψ_m . 【Conclusion】INF and 5-AZA-CdR obviously promoted the apoptosis of HL-60 and K562, and its mechanism maybe related to the up-regulation of the mRNA expressions of Xaf1, the down-regulation of the proportion of Bcl-2(Bcl-xl)/Bax and decrease of ψ_m .

Key words: leukemia, myeloid; IFN- γ -stimulated genes; 5-aza-2-deoxycytidine; methylation; XIAP-associated factor 1

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2007, 28(3):274-278]

收稿日期: 2007-01-15

基金项目: 广东省科技计划项目基金资助 (2006B36301003)

作者简介: 黄云燕 (1972-), 女, 云南昆明人, 博士生, 主治医师, E-mail: yhuang586@126.com; 李文益, 教授, 博士生导师, 通讯作者, E-mail: liwenyisums@yahoo.com.cn

凋亡 (apoptosis) 是受基因调控的细胞固有的主动消亡过程, 在维持组织稳态中起着极其重要的作用, 细胞凋亡受阻是导致肿瘤发病和耐药的主要病理学基础之一。凋亡抑制蛋白 (inhibitors of apoptosis, IAPs) 家族是目前已知的唯一的内源性凋亡执行者-天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶 (cysteine aspartate-specific protease, Caspase) 的抑制物, 其中 XIAP (X-chromosome-linked inhibitors of apoptosis) 的作用最强有力^[1]。最近从酵母双杂交系统中获得了一种 XIAP 负调节蛋白-Xaf1 (XIAP-associated factor 1), 能直接结合 XIAP 而阻断后者抗 Caspase 的活性^[2]。IAPs 在白血病等多种恶性肿瘤中过度表达^[3,4], 相反, Xaf1 广泛表达于所有的正常组织中, 但在 NCI 60 种肿瘤细胞株中表达很低或不能检测到^[5]。Xaf1 降低不能拮抗 XIAP 抗凋亡的活性, 细胞存活几率增加可能导致了肿瘤的发生^[6], 通过增加 XIAP 内源性拮抗剂 Xaf1 的表达是一个新的癌症治疗靶点。基因工程可以增加肿瘤细胞 Xaf1 表达并诱导其凋亡^[7], 但是由于其靶向性差、转染率低、导致基因突变等具体技术问题尚未解决, 限制了临床应用。应用化疗药物干扰素 (interferon, INF) 和 5-杂氮脱氧胞嘧啶核苷 (5-aza-2'-deoxycytidine, 5-AZA-CdR)^[8,9] 诱导其表达并促进凋亡可能更切实际。它们是否能在白血病细胞中诱导 Xaf1 表达尚未见报道。本文通过单独和联合 INF 和 5-AZA-CdR 作用于髓系白血病细胞株 HL-60 和 K562, 探讨其作用机制。

1 材料与方法

1.1 细胞株和主要试剂

HL-60 和 K562 细胞株分别来自中山大学肿瘤防治中心和中山大学动物实验中心。200 mL/L 胎牛血清 (FCS) 购自杭州四季青公司, DMEM 低糖型细胞培养液购自 Gibco 公司。TRIzol Reagent 购自 Invitrogen 公司, ReverTra Dash™ RT-PCR Kit 和 Taq 酶购自东洋纺 (上海) 生物科技有限公司, 引物由上海生工生物工程技术有限公司鉴定和合成。Bcl-2、Bcl-xl 和 Bax 抗体购自美国 Southern Biotech 公司和 Labvision 公司。JC-1 购自美国 Sigma 公司。Annexin V-FITC/kit 细胞凋亡检测试剂盒购自 Caltag Laboratories 公司。INF 购自美国 Sigma 公司。5-AZA-CdR 购自美国 Merck 公司。

1.2 细胞培养

髓系白血病细胞株 HL-60 和 K562 常规悬浮培养于含 10% 热灭活 (56 °C, 30 min) FBS 的 DMEM 低糖型细胞培养液 (pH 7.2~7.4), 置于 37 °C、体积分数 5% CO₂ 饱和湿度的培养箱中, 每 2~3 d 传代 1 次。

1.3 药物处理

每孔接种 5×10^5 个细胞, 分为空白对照组、INF 组、不同浓度 5-AZA-CdR 组以及 INF 和 5-AZA-CdR 联合作用组 (共 6 组), 终浓度分别设置为 INF 1 000 U/mL、5-AZA-CdR 1 μmol/L 和 5 μmol/L。经上述药物处理 48 h 后, 离心收集细胞备用。

1.4 RT-PCR 检测

TRIzol 提取细胞总 RNA, 在 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳下见 3 条清晰的条带 (28 S, 18 S, 5 S), 并用紫外分光光度计检测 260 nm 和 280 nm 的吸光度值, 计算总 RNA 的浓度和纯度。根据 ReverTra Dash™ RT-PCR Kit 提示 20 μL 逆转录体系含总 RNA 2 μL、随机引物 1 μL、RNase Free H₂O 9 μL、5 × RT Buffer 4 μL、dNTP Mixture 2 μL、RNase Inhibitor 1 μL、ReverTra Ace 1 μL, 42 °C 20 min, 99 °C 5 min 灭活逆转录酶, 获得 cDNA 保存于 -20 °C。取 10 μL cDNA、系列特异性上、下游引物各 0.5 μL 和 KOD Dash 1 μL 等 50 μL 反应体系进行 PCR 扩增, 条件 94 °C 30 s, 60 °C 30 s, 72 °C 1 min, 35 次循环后 72 °C 10 min 延长。产物经 SYBR GREEN I 染色后 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳 (80 V, 40 min), 紫外灯下照相, 并用凝胶成像分析系统进行半定量分析, 以相关基因与内参照 G3PDH 的比值代表其 mRNA 水平。Xaf1 上游引物 5' TCC GGA ATT CAT GCT CCA CGA GTC CTA CTG 3'; 下游引物 5' ACG CGT CGA CAA ACT CTG AGT CTG GAC AAC 3', PCR 产物为 260 bp。XIAP 上游引物 5' GAA GAC CCT TGG GAA CAG CA 3'; 下游引物 5' CGC CTT AGC TGC TCT TCA GT 3', PCR 产物为 380 bp。内参照 G3PDH 上游引物 5' ACC ACA GTC CAT GCC ATC AC 3'; 下游引物 5' TCC ACC ACC CTG TTG CTG TA 3', PCR 产物为 450 bp。

1.5 流式细胞检测

1.5.1 Bcl-2 家族成员 收集 1×10^6 /mL 细胞用 PBS 洗涤 2 次后重悬为 50 μL, 加入 100 μL

FIX&PERM试剂 A 液, 室温放置 15 min, PBS 洗涤 1 次, 再加入 100 μL FIX&PERM 试剂 B 液, 分别加入 10 μL 相应抗体摇匀, 4 $^{\circ}\text{C}$ 避光放置 20 min, PBS 洗涤 2 次, 0.5 mL PBS 重悬, 细胞仪检测。

1.5.2 线粒体膜电位 收集(1~2) $\times 10^6/\text{mL}$ 细胞用 1 mL 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养液重悬, 加入 5 μL 1 mg/mL JC-1 充分混匀, 37 $^{\circ}\text{C}$ 、体积分数 5% CO_2 的培养箱中避光孵育 20 min, 离心去除上清并用 PBS 洗涤两次, 重悬后取少量细胞悬液涂片在荧光显微镜下观察, 其余送流式细胞仪检测。

1.5.3 细胞凋亡 收集 $1 \times 10^6/\text{mL}$ 细胞用 PBS 洗涤 2 次, 用稀释的结合缓冲液重悬为 (2~5) $\times 10^5/\text{mL}$, 195 μL 细胞悬液加入 5 μL Annexin V-FITC 混匀, 室温孵育 10 min, PBS 洗涤 1 次, 再用 190 μL 结合缓冲液重悬, 加入 10 μL PI, 细胞仪检测。

1.6 统计学处理

计量资料以($\bar{x} \pm s$)表示, 采用 SPSS 13.0 统计软件进行方差齐性检验、单因素方差分析(one-way ANOVA), 两两比较采用 q 检验(Newman-Keuls 法), 检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 Xaf1、XIAP mRNA 的表达

单独用 INF 和 5-AZA-CdR 处理白血病细胞 HL-60 和 K562 48 h 可见 Xaf1 mRNA 表达增加, 且与 5-AZA-CdR 呈剂量依赖性, 三者中 5-AZA-CdR(5 $\mu\text{mol/L}$) 作用最明显。联合应用 INF 和 5-AZA-CdR, Xaf1 mRNA 的表达亦增加, 但与相同剂量的 5-AZA-CdR 比较无显著性差异($P > 0.05$)。单独和联合应用 INF 和不同剂量的 5-AZA-CdR, HL-60 和 K562 细胞 XIAP mRNA 的表达无明显变化。

2.2 Bcl-2 家族成员的改变

INF 不影响 HL-60 细胞 Bcl-2 和 Bcl-xl 的表达, 而使 Bax 的表达增加。而 5-AZA-CdR 使 Bcl-2 和 Bcl-xl 的表达降低, 并具有剂量依赖性; 同时也降低 Bax 的表达。二者联合可使 HL-60 的 Bcl-2 和 Bcl-xl 的表达更低, Bax 的表达亦降低, 但与相同剂量的 5-AZA-CdR 比较无显著性差异(表 1)。

表 1 HL-60 细胞 Bcl-2 家族成员和凋亡的变化

Table 1 Expression of members of Bcl-2 family and apoptosis in HL-60

($\bar{x} \pm s$)

Group	n	Bcl-2	Bcl-xl	Bax	Apoptosis
INF	3	91.9 \pm 4.5	83.7 \pm 2.8	88.2 \pm 5.6 ¹⁾	6.8 \pm 0.8 ¹⁾
AZA(1 $\mu\text{mol/L}$)	3	85.3 \pm 4.5 ^{1,2)}	70.4 \pm 3.2 ^{1,2)}	65.7 \pm 6.4 ^{1,2)}	9.4 \pm 2.3 ^{1,2)}
AZA(5 $\mu\text{mol/L}$)	3	75.6 \pm 2.6 ^{1,2,3)}	61.8 \pm 5.5 ^{1,2,3)}	69.5 \pm 4.4 ^{1,2)}	11.0 \pm 2.7 ^{1,2,3)}
INF +AZA(1 $\mu\text{mol/L}$)	3	76.4 \pm 4.1 ^{1,2)}	67.6 \pm 4.3 ^{1,2)}	72.6 \pm 6.4 ^{1,2)}	12.4 \pm 3.3 ^{1,2,3,4)}
INF +AZA(5 $\mu\text{mol/L}$)	3	64.8 \pm 1.0 ^{1,2,3,5)}	60.2 \pm 6.2 ^{1,2,3,5)}	75.4 \pm 6.4 ^{1,2)}	16.6 \pm 6.5 ^{1,2,3,4,5)}
Control	3	92.4 \pm 3.8	81.0 \pm 3.4	82.1 \pm 3.7	5.1 \pm 0.4
F		10.457	5.439	6.658	4.528
P		0.000	0.008	0.003	0.015

1)compared with control group, $P < 0.01$; 2)compared with INF group, $P < 0.01$; 3)compared with 5-AZA-CdR(1 $\mu\text{mol/L}$) group, $P < 0.05$; 4) compared with 5-AZA-CdR(5 $\mu\text{mol/L}$) group, $P < 0.01$; 5)compared with INF +5-AZA-CdR(1 $\mu\text{mol/L}$) group, $P < 0.05$

K562 细胞 Bcl-2 表达很低, 而 Bcl-xl 高表达。INF 或不同剂量的 5-AZA-CdR 不改变 Bcl-xl 的表达, 却明显提高 Bax 的表达, 三者中以 INF 的作用最明显; 二者无协同作用(表 2)。

2.3 跨膜电位的影响

INF 和 5-AZA-CdR 可使 HL-60 和 K562 细胞线粒体膜电位降低, 胞浆内的绿色荧光增加, 二者并无协同作用(图 1)。

2.4 细胞凋亡的影响

INF 和不同剂量的 5-AZA-CdR 均能使 HL-60 和 K562 细胞凋亡, 并随着 5-AZA-CdR 剂量增加, 肿瘤细胞凋亡增多; INF 和 5-AZA-CdR 对 HL-60 和 K562 细胞都具有协同作用(表 1、2)。

3 讨论

凋亡异常与肿瘤等多种疾病的发生密切相关, 由于凋亡抑制蛋白的减少或缺失, 和/或亲凋

表2 K562细胞Bcl-2家族成员和凋亡的变化

Table 2 Expression of members of Bcl-2 family and apoptosis in K562

Group	n	Bcl- xl	Bax	Apoptosis
INF	3	94.2±4.0	91.6±3.8 ¹⁾	24.5±4.0 ¹⁾
AZA(1 μmol/L)	3	88.6±7.4	86.8±3.7 ^{1),2)}	28.5±4.6 ^{1),2)}
AZA(5 μmol/L)	3	95.0±4.8	86.4±7.3 ^{1),2)}	32.0±4.3 ^{1),2),3)}
INF +AZA(1 μmol/L)	3	92.2±6.3	85.0±6.7 ^{1),2)}	30.6±5.8 ^{1),2),3)}
INF +AZA(5 μmol/L)	3	87.8±7.6	86.8±5.4 ¹⁾	37.5±7.0 ^{1),2),3),4),5)}
Control	3	93.3±4.7	74.3±5.4	20.3±3.3
F		0.740	3.255	4.302
P		0.608	0.044	0.018

1)compared with control group, $P < 0.01$; 2)compared with INF group, $P < 0.05$; 3)compared with 5-AZA-CdR(1 μmol/L) group, $P < 0.01$; 4)compared with 5-AZA-CdR(5 μmol/L) group, $P < 0.01$; 5) compared with INF +5-AZA-CdR(1 μmol/L) group, $P < 0.01$

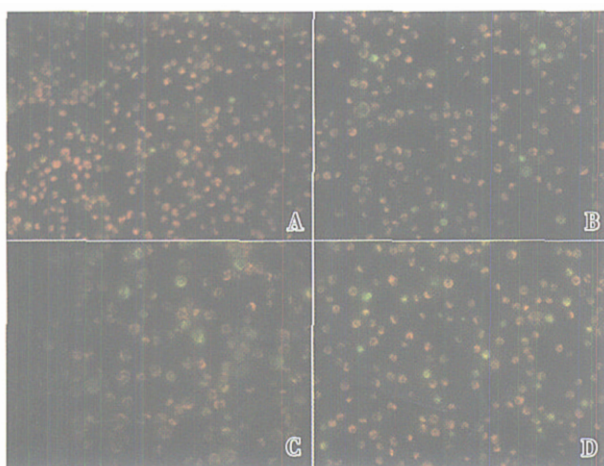


图1 HL-60用药前后线粒体膜电位荧光显微照片

Fig.1 Fluorescent photos of JC-1 in HL-60 before and after treated by INF or 5-AZA-CdR(×100)

A:control; B:INF 1 000 U/mL; C:5-AZA-CdR 1 μmol/L; D:5-AZA-CdR 5 μmol/L

亡蛋白过度表达,细胞凋亡受阻则导致了恶性肿瘤的发生。Xaf1和XIAP是一对相互作用的凋亡调节蛋白,在血液系统恶性肿瘤中普遍存在Xaf1低表达或和XIAP高表达的失调,逆转Xaf1/XIAP的异常状态可以作为血液系统肿瘤治疗的策略。Fong等^[5]在K562细胞中基本上检测不到Xaf1 mRNA,而XIAP mRNA高表达;相较于HL-60细胞中存在Xaf1 mRNA表达,略低于XIAP mRNA表达。我们希望在两种Xaf1和XIAP表达状态不同的白血病细胞株中,是否都可以通过改变Xaf1/XIAP的比例而达到凋亡诱导的目的?

Xaf1作为新发现的干扰素刺激基因(IFN-stimulated genes,ISGs)^[6]可以上调Xaf1 mRNA的表达,并致敏人类黑素瘤细胞对TRAIL/Apo2L诱导的凋亡^[10,11],本实验证实INF可以诱导HL-60和K562 Xaf1表达。在胃肠道肿瘤细胞中Xaf1低表达或表达缺失可能与基因甲基化有关^[9]。目前已应用于临床试验的5-AZA-CdR(5-aza-2-deoxycytidine)是特异的DNA甲基化转移酶抑制剂,不参与RNA和DNA的合成,通过与DNA甲基化转移酶形成共价键而使后者失活,恢复DNA的低甲基化状态,有利于基因转录和蛋白质表达。实验中不同剂量的5-AZA-CdR也可使HL-60和K562细胞的Xaf1 mRNA表达增加,且Xaf1表达与5-AZA-CdR呈剂量依赖性;5-AZA-CdR的作用优于INF,二者不具有协同作用。单用或联合INF和5-AZA-CdR都不改变它们XIAP mRNA的表达。推测INF和5-AZA-CdR可以通过增加Xaf1的表达,逆转Xaf1/XIAP的比例,拮抗XIAP抗Caspase的作用而诱导这两种白血病细胞凋亡。

细胞凋亡中线粒体有着举足轻重的作用,其跨膜电位($\Delta\psi$)下降致细胞色素C和凋亡诱导因子(apoptosis-inducing factor,AIF)释放,Caspase-9活化细胞死亡。Bcl-2家族成员主要是通过调节线粒体内外膜的通透能力或稳定屏障功能而实现其凋亡调节的作用。本实验发现INF对HL-60和K562 Bcl-2家族的调节作用相同,不影响Bcl-2和Bcl-xl而增加Bax的表达。5-AZA-CdR对HL-60和K562的作用机制却是不同的,前者的Bcl-2、Bcl-xl、Bax表达都降低,Bcl-2和Bcl-xl的下降更明显;后者的Bcl-2和Bcl-xl不受影响而Bax增加。它们最终均改变了抗凋亡蛋白Bcl-2、Bcl-xl和亲凋亡蛋白Bax的比例,使线粒体膜电位降低,细胞凋亡增加。

JC-1(5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethyl benzimidazolyl carbocyanine iodide)是一种荧光染料,它能渗透到细胞内与线粒体特异性结合。在正常的细胞内线粒体膜电位高,JC-1聚集于线粒体中形成多聚体呈红色荧光,此时激发波长为488 nm,发射波长为590 nm;在凋亡细胞中线粒体膜电位降低,JC-1不能聚集在线粒体内,而以单体形式存在于胞浆中呈绿色荧光,此时的激发波长是488 nm,发射波长是527 nm。JC-1与若丹明123(Rhodamin123)比较能更好地反映线粒

体膜电位的变化^[12]。本实验显示 INF 和 5-AZA-CdR 作用于 HL-60 和 K562 细胞后呈绿色荧光的细胞增多,经流式细胞仪检测绿色荧光增加,红色荧光减弱。

INF 和 5-AZA-CdR 对 HL-60 和 K562 Xaf1 mRNA 的表达、Bcl-2 家族成员的调节以及线粒体膜电位的降低都没有协同作用,却能协同促进细胞凋亡,说明还存在其它作用位点,这有待进一步研究。

参考文献:

- [1] HOLCIK M, KORNELUK R G. XIAP, the guardian angel[J]. *Nat Rev Mol Cell Bio*,2001,2(7):550- 556.
- [2] LISTON P, FONG W G, N. KELLY L, et al. Identification of XAF1 as an antagonist of XIAP anti-Caspase activity[J]. *Nat Cell Biol*,2001,3(2):128- 133.
- [3] DEVERAUX Q L, REED J C. IAP family proteins: suppressors of apoptosis [J]. *Genes Dev*, 1999, 13(3): 239- 252.
- [4] LISTON P, FONG W G, KORNELUK R G. The inhibitors of apoptosis: there is more life than Bcl2[J]. *Oncogene*, 2003, 22(53):8568- 8580.
- [5] FONG W G, LISTON P, RAJCAN-SEPAROVIC E, et al. Expression and genetic analysis of XIAP-associated factor 1 (XAF1) in cancer cell lines [J]. *Genomics*, 2000, 70(1):113- 122.
- [6] HOLCIK M, GIBSON H, ROBERT G, et al. XIAP:

Apoptosis brake and promising therapeutic target [J]. *Apoptosis*, 2001, 6(4):253- 261.

- [7] 夏 焱, 马国川, 郭海霞, 等. Xaf1 与 TNF 协同诱导细胞凋亡机制的初步探索 [J]. *中山大学学报: 医学科学版*, 2006, 27(4): 374- 377.
- [8] CHAWLA-SARKAR M, LINDNER D J, LIU Y F, et al. Apoptosis and interferons: Role of interferon-stimulated genes as mediators of apoptosis [J]. *Apoptosis*, 2003, 8(3):237- 249.
- [9] BYUN D S, CHO K, RYU B K, et al. Hypermethylation of XIAP-associated factor 1, a putative tumor suppressor gene from the 17p13.2 locus, in human gastric adenocarcinomas [J]. *Cancer Res*, 2003, 63(21):7068- 7075.
- [10] BYUN D S, CHO K, RYU B K, et al. Identification of X-linked inhibitor of apoptosis-associated factor-1 as an interferon-stimulated gene that augments TRAIL/Apo2L-induced apoptosis [J]. *J Biol Chem*, 2002, 277(32):28504- 28511.
- [11] MAMTA C S, DOUGLAS W L, BARBARA S J, et al. IFN-pretreatment sensitizes human melanoma cells to TRAIL/Apo2 ligand-induced apoptosis [J]. *J Immunol*, 2002, 169(2):847- 855.
- [12] ANDREA C, STEFANO S. Flow cytometric analysis of mitochondrial membrane potential using JC-1 [J]. *Cytometry*, 2000, 9(14):1- 7.

(编辑 张恩健)

(上接第 253 页 from page 253)

- [5] WOLF D, WITTE V, LAFFERT B, et al. HIV-1 Nef associated PAK and PI3-kinases stimulate Akt-independent Bad-phosphorylation to induce anti-apoptotic signals[J]. *Nat Med*, 2001, 7(11):1217- 1224.
- [6] OLIVETTA E, FEDERICO M. HIV-1 Nef protects human-monocyte-derived macrophages from HIV-1-induced apoptosis[J]. *Exp Cell Res*, 2006, 312(6):890- 900.
- [7] GREENWAY A L, MCPHEE D A, ALLEN K, et al. Human immunodeficiency virus type 1 Nef binds to tumor suppressor p53 and protects cells against p53-mediated apoptosis[J]. *J Virol*, 2002, 76(6):2692- 2702.
- [8] CHOI H J, SMITHGALL T E. HIV-1 Nef promotes survival of TF-1 macrophages by inducing Bcl-XL expression in an extracellular signal-regulated kinase-dependent manner [J]. *J Biol Chem*, 2004, 279(49): 51688- 51696.
- [9] LEE S B, PARK J, JUNG J U, et al. Nef induces

apoptosis by activating JNK signaling pathway and inhibits NF-kappaB-dependent immune responses in *Drosophila* [J]. *J Cell Sci*, 2005, 118(9):1851- 1859.

- [10] RASOLA A, GRAMAGLIA D, BOCCACCIO C, et al. Apoptosis enhancement by the HIV-1 Nef protein [J]. *J Immunol*. 2001, 166(1):81- 88.
- [11] SHINYA E, OWAKI A, SHIMIZU M, et al. Endogenously expressed HIV-1 nef down-regulates antigen-presenting molecules, not only class I MHC but also CD1a, in immature dendritic cells [J]. *Virology*, 2004, 326(1):79- 89.
- [12] CASARTELLI N, DI MATTEO G, POTESTA M, et al. CD4 and major histocompatibility complex class I downregulation by the human immunodeficiency virus type 1 nef protein in pediatric AIDS progression [J]. *J Virol*, 2003, 77(21):11536- 11545.

(编辑 徐杰)