

DOI:10.3724/SP.J.1008.2015.00241

· 论 著 ·

急性早幼粒细胞白血病患者血肿瘤细胞 NLS-RAR α 蛋白的表达与定位

王 慧^{1,2}, 刘北忠^{1,2}, 阳小群², 朱新瑜², 马鹏鹏², 蒋开玲², 钟 梁^{2*}

1. 重庆医科大学附属永川医院中心实验室, 重庆 402160
2. 重庆医科大学临床检验诊断学教育部重点实验室, 重庆 400016

[摘要] **目的** 验证急性早幼粒细胞白血病(APL)患者血肿瘤细胞中带核定位信号的维甲酸受体 α (nuclear localization signal-retinoic acid receptor alpha, NLS-RAR α)蛋白的存在及定位。**方法** 采用蛋白质印迹法验证患者血肿瘤细胞中性粒细胞弹性蛋白酶(neutrophil elastase, NE)的存在;提取患者血肿瘤细胞核蛋白,蛋白质印迹法检测细胞核中 NLS-RAR α 蛋白的表达;FITC/DAPI 双染色免疫荧光法检测患者血肿瘤细胞中 NLS-RAR α 的表达及定位;FITC/PI 双染色激光共聚焦法检测患者血肿瘤细胞中 NLS-RAR α 的表达及定位。以重组腺病毒 Ad-NE 感染的 NB4 细胞中 NLS-RAR α 蛋白的表达及定位作阳性对照,以正常人血中性粒细胞中野生型 RAR α 的表达和定位作阴性对照。**结果** 阳性对照组设置成功。APL 患者血肿瘤细胞中存在 NE 且有 NLS-RAR α 蛋白表达。细胞免疫荧光法、激光共聚焦法检测结果提示 APL 患者血肿瘤细胞 NLS-RAR α 蛋白的表达主要位于胞核。**结论** 成功用 3 种方法检测出 APL 患者血肿瘤细胞中 NLS-RAR α 蛋白的存在并推测其定位,为进一步研究 APL 的早期诊断及复发监测提供了新思路。

[关键词] 维甲酸受体 α ; 核定位信号; 中性粒细胞; 急性早幼粒细胞白血病

[中图分类号] R 733.71 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2015)03-0241-07

Location of NLS-RAR α protein in peripheral blood tumor cells of patients with acute promyelocytic leukemia

WANG Hui^{1,2}, LIU Bei-zhong^{1,2}, YANG Xiao-qun², ZHU Xin-yu², MA Peng-peng², JIANG Kai-ling², ZHONG Liang^{2*}

1. Central Laboratory of Yongchuan Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing 402160, China
2. Key Laboratory of Clinical Diagnostics of Ministry of Education, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China

[Abstract] **Objective** To verify the presence and location of the NLS-RAR α protein in the peripheral blood tumor cells of patients with acute promyelocytic leukemia (APL). **Methods** Western blotting analysis was used to identify the NE enzyme in the peripheral blood tumor cells of APL patients. The nucleoprotein in tumor cells was prepared and NLS-RAR α protein was detected by Western blotting analysis. The expression and location of NLS-RAR α protein in peripheral blood tumor cells of APL patients were examined by FITC/DAPI double immunofluorescence staining and FITC/PI double staining laser confocal microscopy. The expression and location of NLS-RAR α protein in NB4 cells infected with recombinant adenovirus Ad-NE was used as positive control and those of wildtype RAR α in the neutrophils of healthy controls were taken as negative control. **Results** Positive control was successfully established. NE enzyme and NLS-RAR α protein were expressed in peripheral blood tumor cells of APL patients. Immunofluorescence and laser confocal findings indicated that NLS-RAR α protein was mainly located at the nuclei of peripheral blood tumors cells in APL patients. **Conclusion** NLS-RAR α protein has been successfully detected by 3 different methods in the peripheral blood tumor cells of APL patients and its intracellular location has also been proposed, which can contribute to the early diagnosis and recurrence monitoring of APL.

[Key words] retinoic acid receptor α ; nuclear localization signals; neutrophils; acute promyelocytic leukemia

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2015, 36(3): 241-247]

急性早幼粒细胞白血病(acute promyelocytic leukemia, APL)是一类造血干细胞的恶性克隆性疾病,在 FAB 分型中被定义为急性髓细胞白血病 M3 型^[1],其特征是发生 t(15;17)(15q22;17q21)染色体

易位,形成早幼粒细胞白血病-维甲酸受体 α 融合基因(PML-RAR α)^[2],约 90% 的 APL 患者表现为出血并发症^[3],发病迅速,致死率高。现在临床上把具有融合基因 PML-RAR α 作为 APL 的主要诊断依

[收稿日期] 2014-03-05 **[接受日期]** 2014-08-06

[基金项目] 国家自然科学基金(81171658),重庆市自然科学基金重点项目(2011BA5037). Supported by National Natural Science Foundation of China (81171658) and Natural Science Foundation Project of CQ CSTC (2011BA5037).

[作者简介] 王 慧,硕士生. E-mail: 515395494@qq.com

* 通信作者 (Corresponding author). Tel: 023-68485388, E-mail: lbz2753@qq.com

据。根据 *PML* 基因断裂点不同, *PML-RAR α* 融合基因可分为 L 型、V 型、S 型 3 种, 所占比例分别为 50%、5%、45%^[4]。本文研究的是长型(L 型)。该融合基因表达的 *PML-RAR α* 融合蛋白干扰了野生型 *RAR α* 的信号传递和 *PML* 及其核体(NBs)的正常结构与功能^[5], 在 APL 的发生、发展中起了关键作用。但 *PML-RAR α* 融合蛋白并非始终以整体的形式发挥作用。Lane 等^[6]发现, 中性粒细胞弹性蛋白酶(neutrophil elastase, NE)可将 *PML-RAR α* 融合蛋白切割成相对分子质量为 52 000 的缺失核定位信号的早幼粒白血病蛋白[*PML(NLS⁻)*]和相对分子质量为 61 000 的带核定位信号的维甲酸受体 α (*NLS-RAR α*)两种变异蛋白。且文献^[7]报道, *PML-RAR α* 转染入早期髓细胞中, 很容易发展成为 APL 白血病细胞; 但将其转染入晚期髓细胞, 却不能发展为 APL 细胞。Lane 等^[8]的后续研究也表明, 在不含 NE 的早期髓细胞中, 单纯导入的 *PML-RAR α* 未被裂解, 其发生 APL 的概率仅为 2%~3%, 远低于富含 NE 的早期髓细胞。

本课题前期研究中, 我们选择 NB4 作为 APL 代表细胞株。由于 NB4 中不含有 NE^[6], 我们构建了重组腺病毒 Ad-NE, 将 NE 转入 NB4 细胞来模拟这种切割作用变化, 并证实了这种切割会造成相应蛋白分布位置的变化^[6-9]。在 APL 患者的疾病发展早期有 NE 的作用, 因此在本实验中我们希望通过收集初诊 APL 患者的血液并分离得到肿瘤细胞, 用感染成功的 NB4 细胞做阳性对照, 来验证是否在患者的疾病发展中也存在这种切割作用, 并对切割产物 *NLS-RAR α* 蛋白进行验证和定位, 为以后运用于临床奠定基础。

1 材料和方法

1.1 标本来源 急性早幼粒细胞白血病患者血样(经确诊为 M3-L 型)及正常人血样皆由重庆医科大学附属第一医院提供, 10 例患者为 20~35 岁女性, 均为初诊, 未经治疗, 白血病细胞含量均大于 70%。正常人血来源于 25~35 岁健康体检女性。重组腺病毒 Ad-NE 和 Ad-KZ(空载)由本课题组前期构建保存, NB4 细胞株由重庆医科大学临床检验诊断学实验室保存。

1.2 主要试剂 培养 NB4 细胞的 RPMI 1640 培养基、胎牛血清(FBS)购自美国 Gibco 公司; 高保真 *Taq* DNA 多聚酶、PCR mixture、总 RNA 提取试剂盒、反转录试剂盒购自日本 TaKaRa 公司; 琼脂糖购

自美国 Invitrogen 公司; 红细胞裂解液、人外周血中性粒细胞分离液购自天津灏洋生物公司; 细胞质核蛋白提取试剂盒、RIPA 细胞裂解液、核染料 PI 和 DAPI 均购自碧云天生物技术研究; 兔抗人 NE 多抗、兔抗人 Histone H₃ 多抗购自 Bioworld 公司; 兔抗人 *RAR α* 多抗购自美国 Santa Cruz 公司; 鼠抗人 β -actin 单抗、HRP 标记的羊抗兔和羊抗鼠的 IgG、异硫氰酸荧光素(FITC)标记的羊抗兔 IgG 均购自北京中杉金桥生物技术有限公司, 引物合成由生工生物工程(上海)股份有限公司完成。

1.3 阳性对照组细胞的制备

1.3.1 细胞培养 NB4 细胞用含 20% 优质胎牛血清的 RPMI 1640 培养基, 于 37℃、5%CO₂ 的饱和湿度孵箱内常规培养, 每 1~2 d 换液传代, 选择对数生长期的细胞用于后续实验。

1.3.2 重组腺病毒感染 NB4 细胞感染效率检测 用重组腺病毒 pAdEasy-NE 和阴性对照腺病毒 Ad-KZ 感染 NB4 细胞, 48 h 后收集细胞, 流式细胞仪检测感染效率。效率合格后, 收集细胞用于后续实验。

1.3.3 RT-PCR 检测感染细胞中 NE mRNA 的表达 取对数生长期的 NB4 细胞分别感染重组腺病毒 pAdEasy-NE 及阴性对照腺病毒 Ad-KZ, 48 h 后提取细胞总 RNA, 取 2 μ L 测浓度。分别取 RNA 各 500 ng 反转录成 cDNA。分别取 1.5 μ L cDNA 产物进行 PCR。通过查询 NCBI, 找到 NE 基因的 CDS 序列, 设计引物, 上游引物序列: 5'-TACAAGCTTATGACCCTCGGCCGCCGA-3', 下游引物序列: 5'-ATCGATATCTCAGTGGGTCCT-GCTGGC-3', 扩增片段长度为 803 bp。PCR 反应条件: 94℃ 预变性 5 min; 94℃ 变性 30 s, 58℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 50 s, 共 34 个循环; 72℃ 再延伸 5 min。取 PCR 产物各 10 μ L 进行 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测。以未感染病毒的细胞为对照。

1.4 人外周血肿瘤细胞和中性粒细胞的提取 取 2 mL 新鲜抗凝血, 与 PBS 稀释液 1:1 混匀后小心加于 4 mL 人血中性粒细胞分离液液面上, 500 \times g 离心 25 min。此时离心管中由上至下细胞分 4 层, 弃去第 1 层和第 2 层, 收集第 3 层和第 4 层, 放入含 10 mL PBS 的试管中, 充分混匀后, 以 500 \times g 离心 30 min 洗涤, 去上清后加入 3~5 倍体积的红细胞裂解液, 吹打混匀, 反应 2 min 后 500 \times g 离心 3 min, 然后再用 PBS 反复洗涤 3 次, 离心后即所需的肿瘤细胞(对照组为中性粒细胞), 可用于后续实验。

1.5 血肿瘤细胞 NE 的检测 采用蛋白质印迹法。

分别收集患者血肿瘤细胞、正常人血中性粒细胞以及重组腺病毒 pAdEasy-NE 感染 48 h 后的 NB4 细胞, RIPA 裂解后提取细胞总蛋白, 用 BCA 法定量, 分别取 100 μ g 蛋白进行 SDS-PAGE 电泳, 以半干转膜法转至 PVDF 膜上, 用含 5% 脱脂奶粉的 TBST 封闭 4 h 后, 加入兔抗人 NE 多抗(5%脱脂奶粉 1 : 500 稀释), 4 $^{\circ}$ C 8 h。洗膜: 用 TBST 洗 2 次, 每次 10 min, 再用 TBS 洗 10 min, 加入羊抗兔 IgG(5%脱脂奶粉 1 : 1 000 稀释), 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h, 然后洗膜(步骤同上)。于暗室化学发光显影成像。以 β -actin 作为内参。

1.6 血肿瘤细胞 NLS-RAR α 蛋白表达的检测 采用蛋白质印迹法。分别收集患者血肿瘤细胞、正常人血中性粒细胞、重组腺病毒 pAdEasy-NE 感染 48 h 后的 NB4 细胞, 按说明书分别提取胞核蛋白, 用 BCA 法定量, 分别取 100 μ g 蛋白, 进行 SDS-PAGE 电泳, 以半干转膜法转至 PVDF 膜上, 用含 5% 脱脂奶粉的 TBST 封闭 4 h 后, 加入兔抗人 RAR α 多抗(5%脱脂奶粉 1 : 500 稀释), 4 $^{\circ}$ C 8 h。洗膜: 用 TBST 洗 2 次, 每次 10 min, 再用 TBS 洗 10 min, 加入羊抗兔 IgG(5%脱脂奶粉 1 : 500 稀释), 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h, 然后洗膜(步骤同上), 最后进行化学发光显色和成像分析。以 Histone H $_3$ 作为核内参。

1.7 血肿瘤细胞 NLS-RAR α 蛋白的表达及定位

1.7.1 免疫荧光法 分别收集患者血肿瘤细胞、正常人血中性粒细胞、重组腺病毒 pAdEasy-NE 感染 48 h 后的 NB4 细胞, 用 PBS 洗 3 次, 各取 10 μ L 涂片; 用 4% 多聚甲醛固定 20 min 后, PBS 漂洗 3 次; 再用 0.1% Triton X-100 透膜处理 15 min。10% 山羊血清室温封闭 30 min, 加上兔抗人 RAR α 抗体(封闭血清 1 : 200), 4 $^{\circ}$ C 过夜。PBS 洗 3 次, 加上 FITC 标记的荧光二抗(封闭血清 1 : 200), 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h。PBS 洗 3 次, 加入核染色液 DAPI 5 min, PBS 漂洗 3 次, 用 70% 甘油封固, 荧光显微镜下观察拍照。

1.7.2 激光共聚焦显微镜法 除核染液换成 PI 外, 制作片子方法与 1.7.1 项下免疫荧光相同。以红绿双色荧光通道扫描观察。绿光的激发波长为 488 nm, 在 600 nm 波长以上观察。红光的激发波长为 540 nm, 在 600 nm 波长以上观察。每张切片选取荧光表达最强的 10 个视野观察并由计算机扫描软件 LAS AF lite 进行扫描分析。

1.8 统计学处理 采用 SPSS 17.0 统计软件, 用 Student's *t* 检验及方差分析进行统计学分析, 所有

实验独立重复 3 次, RT-PCR 及蛋白质印迹结果均用 Quantity One 进行灰度分析, 实验结果的计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 检验水准(α)为 0.05。

2 结果

2.1 阳性对照组细胞的制备 感染病毒 48 h 后, 感染效率达到 70%~80%。PCR 结果显示, Ad-NE 感染组特异性条带位于约 803 bp 处, 大小符合预期; 而 Ad-KZ 空载组在相同位置未出现条带。结果说明 Ad-NE 感染组中 NE 基因成功表达其 mRNA (图 1)。

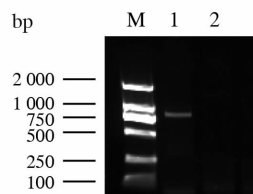


图 1 RT-PCR 产物凝胶电泳图

Fig 1 Gel electrophoresis result of RT-PCR products

M: DL2000; 1: Ad-NE group; 2: Ad-KZ group

2.2 血肿瘤细胞中 NE 的检测 患者组、正常人组、转染 NB4 组(阳性对照组)在 29 000 附近均出现了与 NE 蛋白相对分子质量大小相近的特异性条带。这说明患者血肿瘤细胞和正常人血中性粒细胞中均含有 NE, 能发生融合蛋白被切割的情况(图 2)。

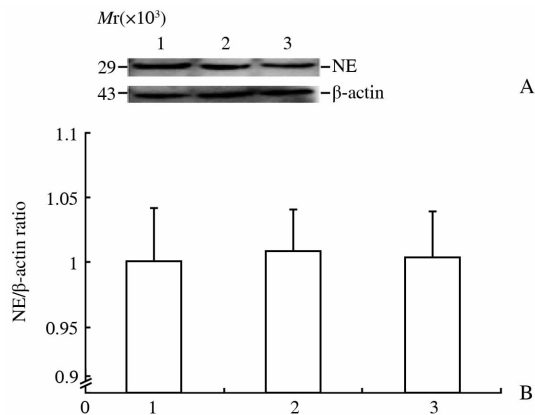


图 2 蛋白质印迹验证患者血肿瘤细胞中的 NE

Fig 2 Western blotting analysis of enzyme NE

expression in peripheral blood tumor cells of APL patients

1: Normal group; 2: APL group; 3: Positive control group. B was the quantitative graphs for A. NE: Neutrophil elastase. $n=3$, $\bar{x} \pm s$

2.3 蛋白印迹法检测血肿瘤细胞 NLS-RAR α 蛋白的表达 患者组和转染 NB4 组(阳性对照组)均在相对分子质量约 61 000 处出现了与 NLS-RAR α 蛋白相对分子质量大小相近的特异性条带,而正常人血细胞在相同位置未出现条带。这说明可以通过蛋白质印迹检测患者血肿瘤细胞中 NLS-RAR α 蛋白的表达情况,以 Histone H $_3$ 作为对照,其相对分子质量约为 20 000 (图 3)。

2.4 患者血肿瘤细胞中 NLS-RAR α 的表达及定位

2.4.1 免疫荧光法 患者血肿瘤细胞中 FITC 染色区域与胞核 DAPI 染色几乎重叠,说明 NLS-RAR α 蛋白在患者血肿瘤细胞中主要在胞核内表达,与转染 NB4 组(阳性对照组)相同。而正常人血中性粒细胞中 FITC 染色区域明显大于胞核 DAPI 染色区域,且胞核区域染色较浅,推测正常人血中性粒细胞中野生型 RAR α 蛋白主要在胞质表达(图 4)。

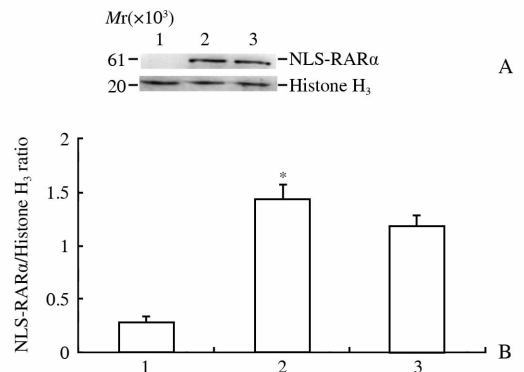


图 3 蛋白质印迹检测患者血肿瘤细胞 NLS-RAR α 蛋白的表达

Fig 3 Western blotting analysis of NLS-RAR α protein expression in peripheral blood tumor cells of APL patients

1: Normal group; 2: APL group; 3: Positive control group. B was the quantitative graphs for A. NLS-RAR α : Nuclear localization signal-retinoic acid receptor alpha. * $P < 0.05$ vs normal group; $n=3$, $\bar{x} \pm s$

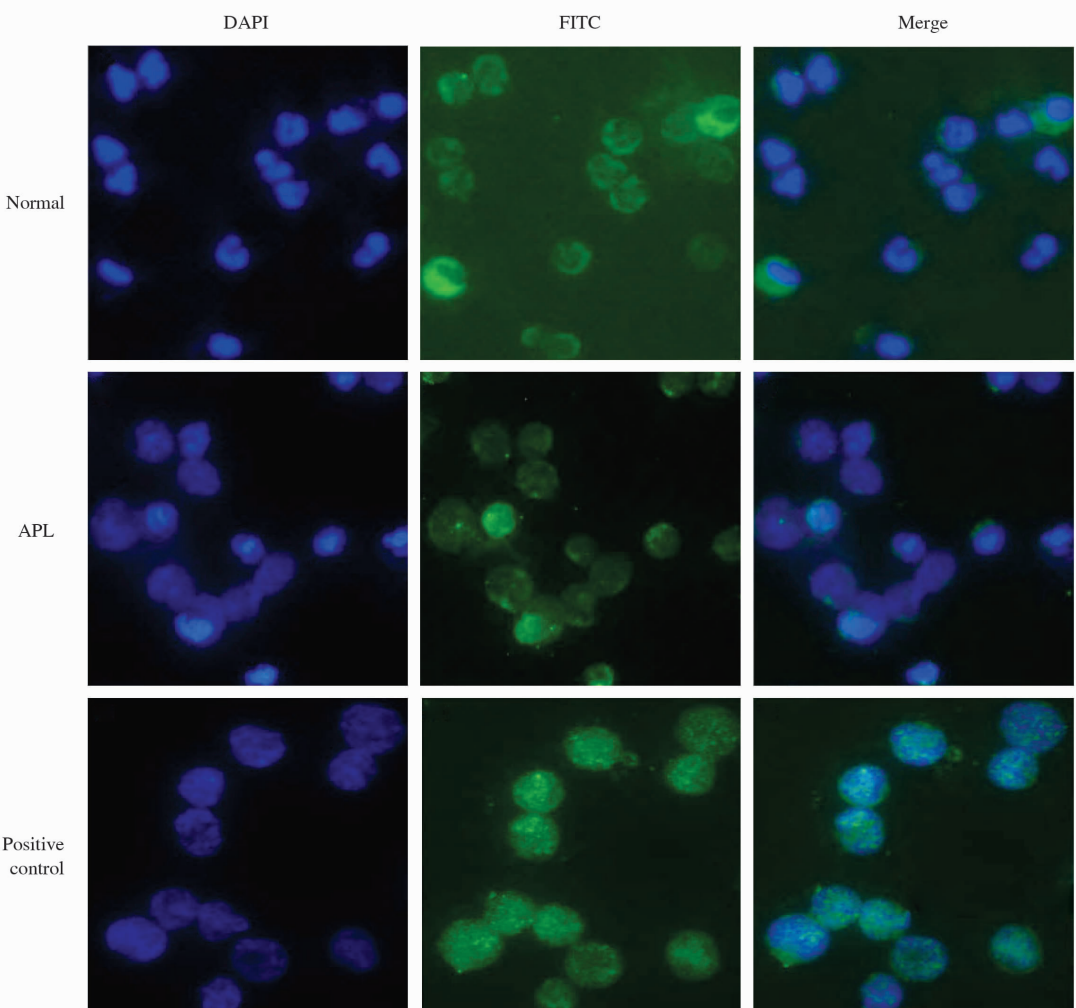


图 4 细胞免疫荧光图

Fig 4 Results of immunofluorescence

DAPI:4', 6-diamidino-2-phenylindole; FITC:Fluorescein isothiocyanate; APL: Acute promyelocytic leukemia. Original magnification: $\times 400$

2.4.2 激光共聚焦显微镜法 患者血肿瘤细胞中 FITC 染色区域与胞核 PI 染色几乎重叠,推测 NLS-RAR α 蛋白在患者血肿瘤细胞中主要在胞核内表达,与阳性对照组相同。正常人血中性粒细胞中

FITC 染色区域明显大于胞核 PI 染色区域,且胞核区域染色较浅,推测野生型 RAR α 蛋白在正常人血中性粒细胞中在胞质、胞核皆有表达,且主要在胞质表达(图 5)。

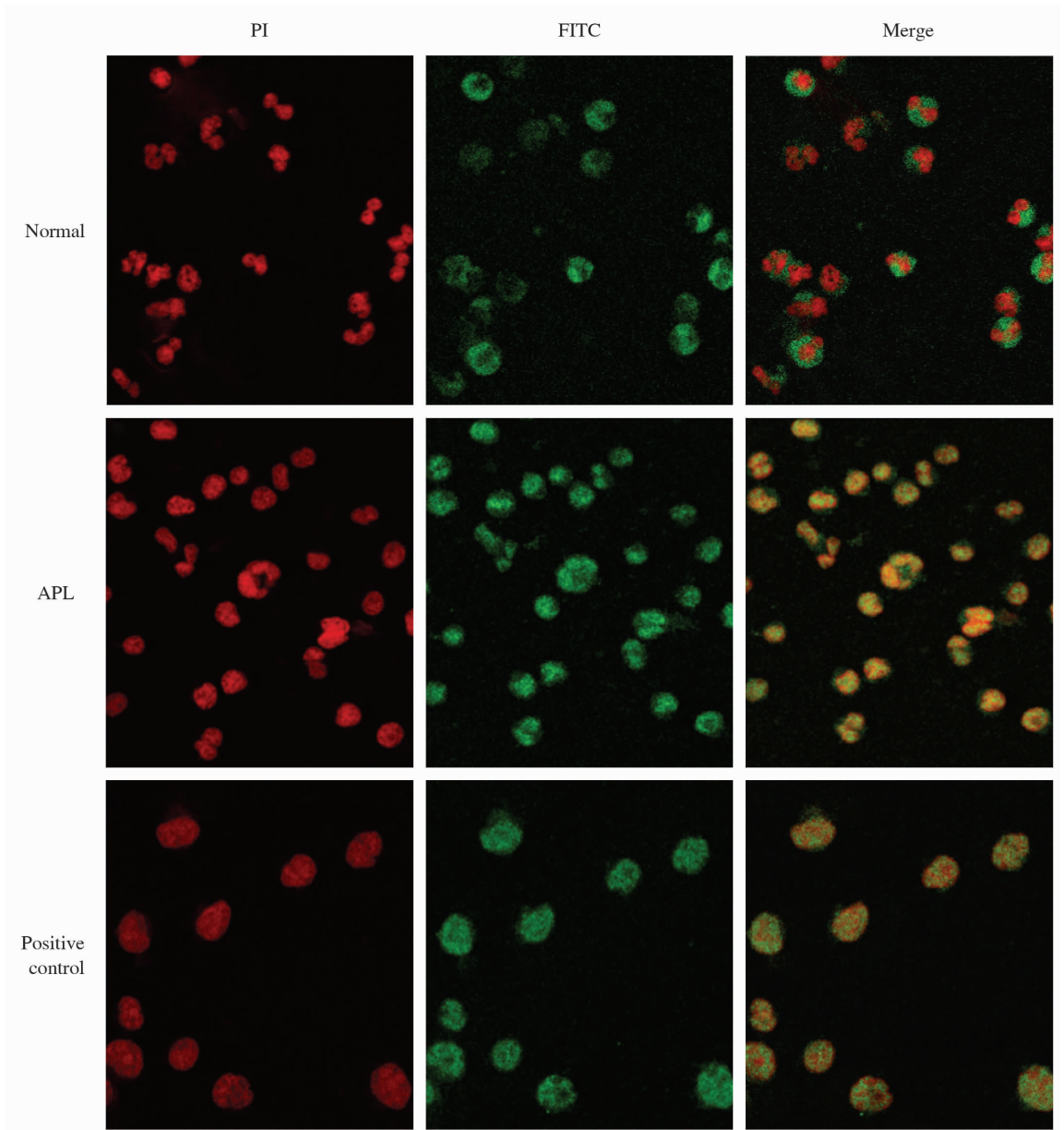


图 5 激光共聚焦图

Fig 5 Results of laser confocal microscope

PI: Propidium iodide; FITC: Fluorescein isothiocyanate; APL: Acute promyelocytic leukemia. Original magnification: $\times 400$

3 讨论

维甲酸是来自维生素 A 与细胞分化相关的一个信号分子家族。生理活性维甲酸通过 RAR 和 RXR 受体介导细胞的转录。RAR α 基因染色体易位,致维甲酸信号受损,导致 APL 的发生。我们通

过前期研究证实了 NE 对 PML-RAR α 切割作用的存在,且 PML(NLS⁻)能够促进细胞增殖,并可能通过上调 *Bcl-2* 和 *c-myc* 基因的表达、下调 *Bax* 基因的表达抑制细胞凋亡^[10]。而 NLS-RAR α 具有促进细胞增殖的作用,并通过上调 *c-myc* 基因的表达,抑制 ATRA 诱导的细胞分化^[11]。且 NLS-RAR α 蛋白

与 Ubiquilin 1 蛋白、JTV1 蛋白、谷氨酰胺连接酶等均有相互作用^[12-14]。NLS 是存在于某些蛋白质上的特殊序列,是介导其入核的特殊信号。NLS 通过被相应的核转运蛋白识别后,与核孔蛋白相互作用,帮助含 NLS 的货物蛋白通过核孔到达细胞核^[15]。因此我们推测 NLS-RAR α 蛋白中 NLS 信号区域在定位中有重要作用。我们发现 NE 切割以后,与野生型相比,原先主要在胞核的 PML 蛋白变成 PML (NLS⁻) 蛋白并大部分转移至胞质,而原本主要在胞质表达的 RAR α 蛋白在切割后,成为 NLS-RAR α 蛋白而迁至胞核。我们以这一系列的变化为线索,展开 NLS-RAR α 蛋白的作用机制和检测方法相关研究。

随着近年来对 APL 的诊断和治疗的研究逐渐深入,包括染色体分析、荧光标记的原位杂交技术 (fluorescence *in situ* hybridization, FISH) 等^[16] APL 常规临床诊断方法逐渐被广泛应用,但 APL 的确诊仍停留在骨髓细胞形态学和细胞遗传学检测上,方法较为单一。最新的研究中对其他检测指标的探索较少。最新有关于肾母细胞瘤 1 基因 (Wilms' tumor 1, WT1) 在 APL 中高表达的报道,但具体机制和特异性尚不明确^[17]。因此,本课题希望通过研究 NLS-RAR α 蛋白,开发一种简便、灵敏、快速、经济、准确的 APL 基因诊断技术应用于临床。

APL 是急性髓细胞白血病的一个特殊亚型,其特点是白细胞异常增生,分化阻滞于早幼粒细胞阶段。其血液学特点表现为外周血及骨髓中出现大量形态异常的早幼粒细胞。外周血白细胞分类计数异常,以早幼粒细胞为主,可高达 90%。因此 APL 患者外周血中存在大量的早幼粒细胞,本研究标本采用 APL 患者外周血的早幼粒细胞和正常人外周血中性粒细胞。本课题希望通过对 APL 患者血肿瘤细胞中 NLS-RAR α 蛋白的存在及定位的验证,为 APL 早期诊断和复发检测新的指标提供思路。故本研究在前期成功重组腺病毒 Ad-NE 的基础上用 3 种方法验证了 APL 患者血肿瘤细胞中 NLS-RAR α 蛋白的存在及定位,以正常人血中性粒细胞作阴性对照,已感染了重组腺病毒 Ad-NE 的 NB4 细胞作阳性对照。先将重组腺病毒 Ad-NE 的 NB4 细胞,用 PCR 验证感染成功,证明其作为 APL 疾病阳性对照组模型的可行性;再用蛋白质印迹法验证

急性早幼粒细胞白血病患者血肿瘤细胞中 NE 的表达,证明该患者作为 APL 疾病模型的可行性。再通过蛋白质印迹法、细胞免疫荧光法、激光共聚焦显微镜观察法检测该患者血肿瘤细胞中 NLS-RAR α 蛋白的表达及定位。实验结果显示,成功获得阳性对照组。成功在患者血肿瘤细胞中检测到 NE 表达,通过蛋白质印迹法检测到患者血肿瘤细胞中 NLS-RAR α 的表达,并通过细胞免疫荧光法、激光共聚焦显微镜观察法推测其主要位于胞核。当然,这 3 种方法的方法学评价和其他新的检测方法有待进一步实验论证和探索。针对 APL 患者不同疾病阶段进行分组,观察 NLS-RAR α 蛋白的定位研究仍需要进一步探索。

综上所述,本研究成功用 3 种方法验证了 APL 患者血肿瘤细胞中 NLS-RAR α 蛋白的表达,并明确其定位于胞核,为进一步研究 APL 的临床诊断和治疗提供了新思路。

4 利益冲突

所有作者声明本文不涉及任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] 顾伟英,胡绍燕,陈子兴,岑建农,曹祥山,何海龙,等. CD34⁺ 急性早幼粒细胞白血病的临床特点及预后[J]. 中华内科杂志, 2010, 5: 432-433.
- [2] Lengfelder E, Hofmann W K, Nowak D. Treatment of acute promyelocytic leukemia with arsenic trioxide: clinical results and open questions[J]. Expert Rev Anticancer Ther, 2013, 13: 1035-1043.
- [3] Lee H J, Park H J, Kim H W, Park S G. Comparison of laboratory characteristics between acute promyelocytic leukemia and other subtypes of acute myeloid leukemia with disseminated intravascular coagulation[J]. Blood Res, 2013, 48: 250-253.
- [4] González M, Barragán E, Bolufer P, Chillón C, Colomer D, Borstein R, et al. Pretreatment characteristics and clinical outcome of acute promyelocytic leukaemia patients according to the PML-RAR alpha isoforms: a study of the PETHEMA group[J]. Br J Haematol, 2001, 114: 99-103.
- [5] Laurenzana A, Pettersson F, Miller W H Jr. Role of PML/RAR α in the pathogenesis of APL[J]. Drug Discovery Today: Disease Mechanisms, 2007, 3: 499-505.
- [6] Lane A A, Ley T J. Neutrophil elastase cleaves PML-

- RAR α and is important for the development of acute promyelocytic leukemia in mice[J]. *Cell*, 2003, 115:305-318.
- [7] Westervelt P, Ley T J. Seed versus soil: the importance of the target cell for transgenic models of human leukemias[J]. *Blood*, 1999, 93:2143-2148.
- [8] Lane A A, Ley T J. Neutrophil elastase is important for PML-retinoic acid receptor alpha activities in early myeloid cells[J]. *Mol Cell Biol*, 2005, 25:23-33.
- [9] 王 慧,钟 梁,蒋开玲,朱新瑜,马鹏鹏,阳小群,等. NLS-RAR α 蛋白在重组腺病毒 Ad-NE 感染的 NB4 中定位的验证[J]. *中国细胞生物学报*, 2014, 36:331-337.
- [10] 高远梅,刘北忠,张 曦,胡秀秀,钟 梁. 腺病毒介导的 PML(NLS⁻) 对大黄素引起的 HL-60 细胞存活的影响及其机制[J]. *四川大学学报:医学版*, 2013, 44:703-707.
- [11] 胡秀秀,刘北忠,钟 梁,高远梅,张 曦,吴秀娟,等. Ad-NLS-RAR α 对 HL-60 细胞增殖及 ATRA 诱导的 HL-60 细胞分化的影响及其机制[J]. *四川大学学报:医学版*, 2013, 44:897-901.
- [12] Zhu D, Wang C, Liu B, Wu Y, Zhong L, Wang C. Interaction between nuclear localization signal-retinoic acid receptor alpha and Ubiquilin 1[J]. *Zhong Nan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban*, 2010, 35:649-654.
- [13] 王 翀,王东生,刘北忠,郝 坡,刘 畅,金丹婷,等. 带核定位信号的 RAR α 与 JTV1 蛋白相互作用的验证实验[J]. *四川大学学报:医学版*, 2009, 40:382-384.
- [14] 吴 燕,刘北忠,王 翀,钟 梁,朱 丹,王春光,等. 带核定位信号的 RAR α 与谷氨酰胺连接酶蛋白相互作用的胞内外验证[J]. *第二军医大学学报*, 2010, 31:468-471.
- Wu Y, Liu B Z, Wang C, Zhong L, Zhu D, Wang C G, et al. Verification of interaction between glutamate-ammonia ligase and nuclear localization signal-retinoic acid receptor α protein inside and outside cells [J]. *Acad J Sec Mil Med Univ*, 2010, 31:468-471.
- [15] 赵元茵,王元忠,曹 念,周度金,李渝萍. 核定位信号及其分析策略[J]. *中国生物化学与分子生物学报*, 2009, 25:683-689.
- [16] 汪红梅,翁少煌,林丽清,林新华,陈元仲. 计时电量法用于检测急性早幼粒细胞白血病 PML/RAR α 融合基因的研究[J]. *分析测试学报*, 2011, 30:872-876.
- [17] Hecht A, Nolte F, Nowak D, Nowak V, Reinwald M, Hanfstein B, et al. Prognostic importance of expression of the Wilms' tumor 1 gene in newly diagnosed acute promyelocytic leukemia[J]. *Leuk Lymphoma*, 2014, 26:1-28.

[本文编辑] 尹 茶