恶性肿瘤的分子诊断 文章编号:0253-3626(2011)06-0785-05

硼替佐米诱导 TF-1 细胞凋亡及其对 SALL4 基因表达的影响

王 兰,喻依川,傅雷华,胡成琳,陈 林
(重庆医科大学附属第二医院血液科,重庆 400010)

【摘 要】目的:探讨蛋白酶体抑制剂硼替佐米(Bortezomib)诱导人红系白血病细胞株 TF-1 凋亡的作用,及其对 Sall4 基因表达水平的影响。方法:(1)MTT 法检测细胞增殖抑制率。(2)光学显微镜观察细胞的形态学改变。(3)电镜观察超微结构变化。(4)流式细胞仪检测 Annexin V-FITC 细胞凋亡率。(5)流式细胞仪分析细胞周期。(6)RT-PCR 检测 Sall4 mRNA 的表达水平。结果:(1)硼替佐米呈时间和剂量依赖性抑制 TF-1 细胞生长,与对照组相比,差异有统计学意义($P<0.05$)。24 h 和 48 h 的药物半数抑制浓度(Halfmaximal inhibitory concentration of a substance,IC_{50})分别为 52 nmol/L 和 27 nmol/L。(2)显微镜下观察细胞皱缩变小,细胞密度明显下降。(3)电镜下观察可见凋亡小体。(4)Annexin V-FITC 检测显示随着硼替佐米作用浓度的增加,凋亡率增加,呈剂量依赖关系($P<0.05$)。(5)流式细胞仪分析细胞周期,随着硼替佐米作用时间的增加,G_2/M 期细胞比例逐渐增高,而 G_0/G_1 和 S 期细胞比例则逐渐减少,呈时间依赖关系($P<0.05$)。(6)RT-PCR 结果示 Sall4 基因在 TF-1 细胞上高表达,并随着硼替佐米作用浓度和时间的增加,Sall4 mRNA 与 β-actin mRNA 表达量的积分光密度比值(Integral optical density ratio,V/B)水平下降($P<0.05$)。结论:硼替佐米能抑制 TF-1 细胞增殖,诱导其凋亡,呈时间-剂量依赖关系。Sall4 基因在 TF-1 细胞株上高表达,并随着硼替佐米作用浓度和时间的增加表达水平下降,呈时间-剂量依赖关系。

【关键词】硼替佐米;TF-1 细胞株;细胞凋亡;Sall4 基因
【中国图书分类法分类号】R733.7 【文献标志码】A 【收稿日期】2011-01-27

作者介绍:王 兰(1984-),女,硕士,
研究方向:白血病的靶向治疗。
通信作者:陈 林,女,副教授,Email:chenlincq@sina.com。
基金项目:重庆市卫生局科研资助项目(编号:2009-2-21)。

tralization exerts potent antitumor effects in animal models of colon cancer and melanoma[J].Cancer Res,2006,66(8):4191-4197.

[5] Pandey P,Saleh A,Nakazawa A,et al.Negative regulation of cytochrome c-mediated oligomerization of Apaf-1 and activation of procaspase-9 by heat shock protein 90[J].Embo J,2000,19(16):4310-4322.

[6] Webb C P,Hose C D,Koochekpour S,et al.The geldanamycins are potent inhibitors of the hepatocyte growth factor/scatter factor-met-urokinase plasminogen activator-plasmin proteolytic network[J].Cancer Res,2000,60:342-349.

[7] Blagosklonny M V.p53 from complexity to simplicity:mutant p53 stabilization,gain-of-function,and dominant-negative efect[J].Faseb J,2000,14(13):1901-1907.

[8] Nimmanpalli R,O'Bryan E,Kuhn D,et al.Regulation of 17-AAG induces apoptosis:role of Bcl-2,Bcl-xL,and Bax downstream of 17-AAG mediated down-regulation of Akt,Raf-1,and Src kinases[J].Blood,2003,102(1):269-275.

[9] Nguyen D M,Desai S,Chen A,et al.Modulation of metastasis phenotypes of non-small cell lung cancer cells by 17-allylamino 17-demethoxy geldanamycin[J].Ann Thorac Surg,2000,70(6):1853-1860.

[10] Newcomb E W,Lukyanov Y,Schnee T,et al.The geldanamycin analogue 17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin inhibits the growth of GL261 glioma cells in vitro and in vivo[J].Anticancer Drugs,2007,18(8):875-882.

[11] Hawkins L M,Narendran A.The geldanamycin derivative 17-AAG decreases VEGF secretion and leukemia growth support by trisomy 8 myelodysplastic syndrome bone marrow stromal cells[J].Pediatric Hematology-Oncology,2005,22(2):115-125.

[12] Miao R Q,Fontana J,Fulton D,et al.Dominant-negative Hsp90 reduces VEGF-stimulated nitric oxide release and migration in endothelial cells[J].Am Heart Assoc,2008,25:105.

[13] Ramanathan R K,Trump D L,Eiseman J,et al.Phase Ⅰ pharmacokinetic-pharmacodynamic study of 17-(allylamino)-17-demethoxygeldanamycin (17AAG,NSC 330507),a novel inhibitor of heat shock protein90,in patients with refractory advanced cancers[J].Clin Cancer Res,2005,11(9):3385-3391.

(责任编辑:张学颖)

Induction of apoptosis in TF-1 cell line by bortezomib and its influence on the expression of SALL4 gene

WANG Lan, YU Yi-chuan, FU Lei-hua, HU Cheng-ling, CHEN Lin

(*Department of Hematology, the Second Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To investigate the effect of bortezomib on proliferation and apoptosis of human erythroleukemia cells TF-1, and its influence on the expression of Sall4 mRNA. *Methods*: (1)The level of cell proliferation was analyzed by MTT assay. (2)Morphological changes were observed by microscope. (3)Morphological changes were observed by electron microscope. (4)Flow cytometry with Annexin-V staining was used to analyze cell apoptosis rate. (5)Flow cytometry was used to analyze and cell cycle distribution. (6)The level of the expression of Sall4 mRNA was detected by RT-PCR. *Results*: (1)Bortezomib inhibited TF-1 cells in a time-and-does dependent manner. The IC_{50} at 24 and 48 h were 52 nmol/L and 27 nmol/L respectively. (2)Under microscope, it could be observed that the density of cells declined while cell fragments increased. (3)Moreover, under electron microscope, there appeared some apoptotic bodies. (4)Bortezomib could induce apoptosis of TF-1 cells in a dose-dependent manner. (5)At the same time, it caused an increase in G_2/M phase and a marked decrease in G_0/G_1 and S phases in a time-dependent manner. (6)It was found by RT-PCR that the level of Sall4 mRNA was down-regulated with the treatment of bortemomib. *Conclusion*: Bortezomig can cause apoptosis of TF-1 cells and down-regulate the expression of Sall4 mRNA in a time-and-does dependent manner.

【Key words】bortezomib; TF-1 cell line; cell apoptosis; Sall4 gene

硼替佐米(Bortezomib)是首个获得美国食品和药物管理局批准上市的蛋白酶体抑制剂，其单用及联合其它药物治疗复发、难治的多发性骨髓瘤取得了显著疗效[1-3]。

急性髓系白血病(Acute myeloid leukemia, AML)是我国成人急性白血病的主要类型。近年来研究发现，硼替佐米同样能对 AML 发挥良好的抗肿瘤作用[4]。在 AML 中，红白血病(M6型)治疗效果一直欠佳，故选择人红系白血病细胞株 TF-1 为我们的研究对象。

Sall4 基因是新近发现的原癌基因，对肿瘤的形成和发展，维持干细胞的特性以及调控细胞周期均有重要作用[5]。我们应用硼替佐米处理 TF-1 细胞，观察它对 TF-1 细胞的抑制作用，及其对 Sall4 基因表达水平的影响。现报道如下。

1 材料和方法

1.1 主要试剂

硼替佐米由美国 Millennium 公司生产，用无菌双蒸水配成 1 mg/ml 的母液，-20℃保存备用，待实验时配成 10、30、50 nmol/L 工作液；小胎牛血清购自杭州四季青生物公司；RPMI 1640 培养液为美国 GibcoBRL 公司产品；MTT 购自 Sigma 公司；Annexin-V 细胞凋亡及细胞周期试剂盒均购自南京凯基生物试剂公司；总 RNA 提取试剂盒购自 BioFlux 株式会社；逆转录试剂盒及 PCR 试剂盒购自 TaKaRa 宝生物工程有限公司。登陆 Genebank 查出 Sall4 cDNA 序列(NM_020436)，根据引物设计软件 primer5，设计 SALL4 上游引物：5'-TACCAC-CAAAGGCAACTTAAAGGTTCAC-3'，下游引物：5'-AGAC-AGTGGCGTTATTCACAACGGAGG-3'(320 bp)；内参照 β-actin 上游引物：5'-CATTGTGATGGACTCCGGAGACGG -3'，下游引物：5'-CATCTCCTGCTCGAAGTCTAGAGC-3'(232 bp)；引物由上海生物工程公司合成。

1.2 细胞培养

人红系白血病细胞株 TF-1 由本实验室保存，于含 10%小胎牛血清的 RPMI1640 培养液中，37℃、5% CO_2 孵箱培养，2~3 d 传代 1 次。

1.3 实验步骤

1.3.1 MTT 法测细胞增殖抑制率 取对数生长期细胞调整密度为 2×10^5 个/ml，接种于 96 孔板，每孔 100 μl 接种，实验组分别加入 0、10、30、50 nmol/L 硼替佐米，每浓度设 6 个复孔。培养至 12、24、48 h 后，加入 10 μl MTT(5 mg/ml)，继续孵育 4 h，离心并吸弃上清液，加二甲基亚砜(Dimethyl soulfoxide, DMSO)100 μl/孔，轻震荡 10 min，酶标仪测 570 nm OD 值(A)。抑制率(%)=($A_{阴性对照}-A_{实验}$)/$A_{阴性对照}\times100\%$。采用软件 Prism 计算药物半数抑制浓度(Half maximal inhibitory concentration of a substance, IC_{50})。

1.3.2 倒置光学显微镜观察细胞的形态学改变 将对数生长期细胞以 5×10^5 个接种于 6 孔板中，每孔加样 2 ml。根据实验分组加入 0 nmol/L 或 50 nmol/L 硼替佐米，同等条件下培养 24 h 后，倒置光学显微镜下观察。

1.3.3 电镜观察超微结构变化 将对数生长期细胞以 5×10^5 个接种于 6 孔板中，每孔加样 2 ml。根据实验分组分别加入 0 nmol/L 或 50 nmol/L 硼替佐米，同等条件下培养 24 h，收集细胞，离心后加入 4%的戊二醛，4℃冰箱中保存，2 h 后用 0.1 mol/L 的 PBS 冲洗，1%饿酸固定 1 h，丙酮酸梯度脱水，经酸铀枸橼酸染色后，用电镜观察及拍照。

1.3.4 Annexin V-FITC 检测细胞凋亡率 将对数生长期细胞以 5×10^5 个接种于 6 孔板中，每孔加样 2 ml。用 0、10、30、50 nmol/L 硼替佐米处理 TF-1 细胞，24 h 后收集细胞，PBS 洗 2 次，加 500 μl 缓冲液，混匀后加 5 μl Annexin V-FITC 和

表 1 各浓度组不同时间细胞增殖抑制率比较（$\bar{x}\pm s$，%）

分组(nmol/L)	OD值（$\bar{x}\pm s$）			抑制率（%）		
	12 h	24 h	48 h	12 h	24 h	48 h
0	1.21 ± 0.02	1.24 ± 0.02	1.15 ± 0.03			
10	1.13 ± 0.03△	1.09 ± 0.04*	0.77 ± 0.03*	6.07△	12.39*	3.04*
30	1.06 ± 0.03*	0.83 ± 0.02*	0.56 ± 0.03*	11.89*	32.98*	51.79*
50	0.97 ± 0.02*	0.62 ± 0.03*	0.45 ± 0.01*	19.26*	50.04*	60.59*

注：与对照组相比，△，$P>0.05$；*，$P<0.05$

5 μl PI 液，避光孵育 15 min，用流式细胞仪检测。

1.3.5 流式细胞术分析细胞周期 将对数生长期细胞以 5×10^5 个接种于 6 孔板中，每孔加样 2 ml。用 50 nmol/L 硼替佐米处理 TF-1 细胞，分别于 0、6、12、24 h 收集细胞，PBS 洗涤 2 次后，70%乙醇 4℃过夜，再 PBS 洗涤 1 次，加入 PI，于 4℃避光 30 min，用流式细胞仪检测。

1.3.6 RT-PCR 检测 Sall4 基因表达

1.3.6.1 RNA 提取 将对数生长期细胞以 5×10^5 个接种于 6 孔板中，每孔加样 2 ml。用 0、10、30、50 nmol/L 硼替佐米处理 TF-1 细胞分别于 12、24、48 h 后，按照总 RNA 提取试剂盒步骤提取总 RNA。提取的总 RNA 经紫外分光光度仪测定 260 nm 和 280 nm 处吸收度（A）值，A_{260}/A_{280} 值在 1.80~2.0 者用于RT-PCR。

1.3.6.2 逆转录 20 μl 反应体系。每份标本取 RNA 总量相当于 1 μg，5×RT Buffer 2 μl，Prime Script RT Enzyme Mix 10.5 μl，Oligo dT Primer 0.5 μl，Random six mers 0.5 μl，加 Rnase free dH_2O 至 20 μl。37℃反应 15 min，85℃反应 5 s。

1.3.6.3 PCR 反应 50 μl 反应体系。Premix Taq 25 μl，模板 2.5 μl，上下游引物各 1 μl，灭菌蒸馏水加至 50 μl。94℃预变性 3 min，94℃变性 30 s，60℃退火 30 s，72℃延伸 45 s，循环 30 次，最后 72℃延伸 5 min，终止反应。

1.3.6.4 电泳 每份标本的两管 PCR 反应扩增产物各取 5 μl 加在 15 g/L 琼脂糖凝胶相邻加样孔上电泳，在 GeneGenius成像系统下观察结果。

1.4 统计学方法

数据用$\bar{x}\pm s$表示，各实验组与对照组比较采用方差分析，检验水准为 $\alpha=0.05$，$P<0.05$ 为差异具有统计学性意义。应用 SPSS11.5 统计软件进行分析。实验均重复 3 次。

2 实验结果

2.1 MTT 法测细胞增殖抑制率

相同作用时间的硼替佐米随着作用浓度的增加（10、30、50 nmol/L）与对照组相比，对 TF-1 细胞的生长抑制作用更明显，差异具有统计学意义（$P<0.05$）。相同浓度硼替佐米随着作用时间的增加（12、24、48 h）与对照组相比，对 TF-1 细胞生长抑制作用更明显，差异有统计学意义（$P<0.05$）。根据 IC_{50} 软件Prism计算得出 24 h 和 48 h 的 IC_{50} 分别为为 52、27 nmol/L（图 1、表 1）。

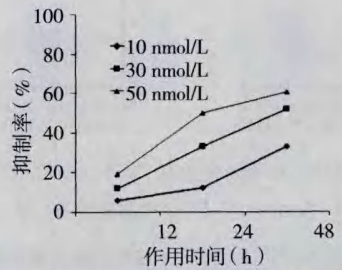


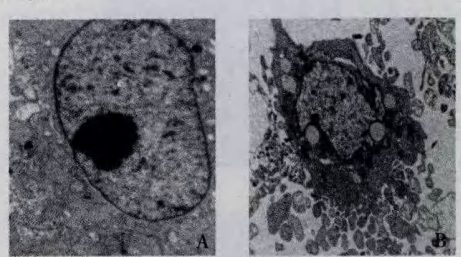
图 1 硼替佐米对 TF-1 细胞增殖抑制作用

2.2 倒置光学显微镜观察细胞的形态学改变

对照组 TF-1 细胞呈悬浮成团生长，细胞呈圆形，大小均一，折光性好。50 nmol/L 硼替佐米作用 24 h 后与对照组比较，细胞碎片增加，细胞密度明显下降。

2.3 电镜观察超微结构变化

电镜下可见对照组 TF-1 细胞核浆比例大，核染色质丰富，异染色质少，核仁清楚。50 nmol/L 硼替佐米作用 TF-1 细胞 24 h 后与对照组比较，细胞体积缩小，胞浆内呈现固缩、空泡化等现象，异染色质增多，核仁减少或消失，可见凋亡小体（见图 2）。



A. 对照组；B. 50 nmol/L 作用 24 h 后凋亡小体出现

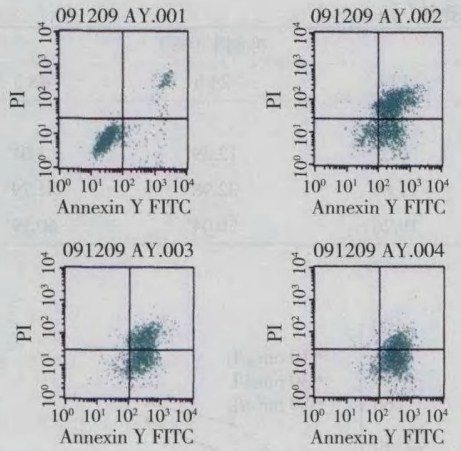
图 2 电镜下细胞超微结构改变（TEM，×6 000）

2.4 Annexin V-FITC 检测细胞凋亡率

0、10、30、50 nmol/L 硼替佐米处理 TF-1 细胞 24 h 后，Annexin V 细胞阳性表达率分别为 27.39%、41.7% 和 65.8%，均高于对照组（5.78%），差异具有统计学意义（$P<0.05$）。显示随着硼替佐米作用浓度的增加，凋亡率增加，呈剂量依赖性（见图 3）。

2.5 流式细胞术分析细胞周期

50 nmol/L 硼替佐米作用于TF-1细胞 0、6、12、24 h 后，G_2/M 期细胞比例逐渐增高，而 G_0/G_1 和 S 期细胞比例则逐渐减少，与对照组相比，差异具有统计学意义（$P<0.05$）。说明硼替佐米能显著抑制 TF-1 细胞的 DNA 复制，并呈时间依赖关系（见表 2）。



A. 对照组；B ~ D. 硼替佐米 10、30、50 nmol/L 作用后

图 3　Annexin V-FITC 检测细胞凋亡率

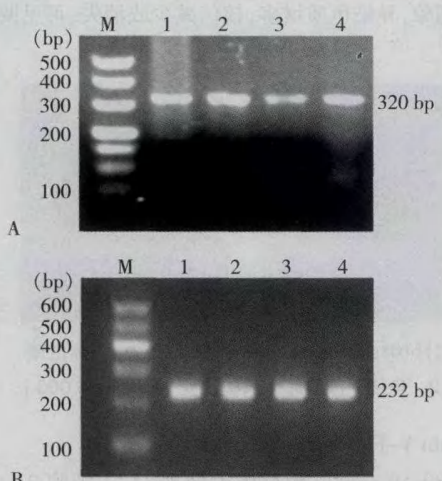
表 2　硼替佐米作用后 TF-1 细胞细胞周期的变化

组别（h）	细胞周期（%）		
	G_0/G_1	S期	G_2/M 期
0	52.57	44.10	22.25
6	32.63*	35.06*	40.19*
12	20.42*	16.80*	76.32*
24	16.91*	7.14*	83.79*

注：与对照组相比 *，$P<0.05$

2.6　RT-PCR 检测 Sall4 mRNA 的表达

2.6.1　TF-1 细胞上 Sall4 基因有表达（图 4）



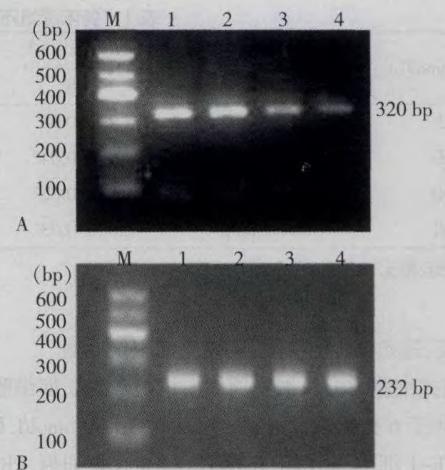
A. M.marker；1 ~ 4. Sall4 基因在 320 bp 出现表达

B. M.marker；1 ~ 4. β-actin

图 4　TF-1 细胞株上 Sall4 基因的表达

2.6.2　硼替佐米作用后 Sall4 基因表达的变化　0、10、30、50 nmol/L 硼替佐米处理 TF-1 细胞 24 h 后，10 nmol/L 组 Sall4 表达量较对照组无明显降低（$P>0.05$）；30、50 nmol/L 组 Sall4 mRNA 表达量较对照组降低，Sall4 mRNA 与 β-actin mRNA 表达量的积分光密度比值（Integral optical density ratio，V/B）下降，差异有统计学意义（$P<0.05$），见图 5，表 3。

50 nmol/L 硼替佐米处理 TF-1 细胞 0、12、24、48 h 后，



A. M.marker；1. 对照组；2~4. 10、30、50 nmol/L 硼替佐米作用后，Sall4 基因表达水平逐渐下降

B. M.marker；1~4. β-actin

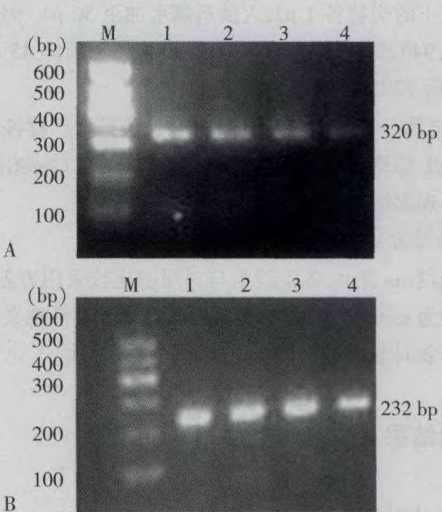
图 5　硼替佐米作用浓度与 Sall4 基因表达水平的关系

表 3　硼替佐米作用浓度与 Sall4 基因表达水平（V/B）

浓度(nmol/L)	24 h
0	0.81
10	0.80△
30	0.41*
50	0.26*

注：与对照组相比△，$P>0.05$，*，$P<0.05$

Sall4 表达量均较对照组降低，Sall4 mRNA 与 β-actin mRNA 表达量的 V/B 下降，差异有统计学意义（$P<0.05$），见图 6，表 4。



A. M. marker；1. 对照组；2~4. 硼替佐米作用 12、24、48 h 后，Sall4 基因的表达水平逐渐下降

B. M. marker；1~4. β-actin

图 6　硼替佐米作用时间与 Sall4 基因表达水平的关系

3　讨　论

白血病是造血干/祖细胞失去进一步分化、成熟的能力

表 4 硼替佐米作用时间与 Sall4 基因表达水平（V/B）

作用时间（h）	50 nmol/L
0	0.67
12	0.55*
24	0.39*
48	0.18*

注：与对照组相比，*，$P<0.05$

从而导致的一组造血系统恶性肿瘤。尽管 AML 经 DA 方案（柔红霉素+阿糖胞苷）化疗，诱导缓解率已达 70%。但是，复发与难治仍然是治疗 AML 最棘手的问题。研究表明，AML 的复发很有可能是源自白血病干细胞对化疗耐药，所以对白血病干细胞的靶向治疗则很有可能会治愈 AML[4]。

硼替佐米诱导肿瘤细胞凋亡的机制在不同细胞中各不相同，主要包括抑制 NF-KB 活化途径。Guzman 等[6]首次发现 NF-KB 在静止期的白血病干细胞上很活跃。由此推论，利用蛋白酶体抑制剂硼替佐米阻止 NF-KB 活性会在根本上治疗 AML。他将蛋白酶体抑制剂与柔红霉素联合作用，诱导白血病干细胞的显著凋亡，而对正常的造血干细胞无明显影响。证明蛋白酶体抑制剂能针对白血病干细胞进行靶向治疗，为硼替佐米治疗 AML 提供重要依据。

已证明多种髓系白血病细胞株对硼替佐米均敏感，特别是M4、M5型高度敏感，单独应用时其IC_{50}剂量在10~50 nmol/L之间[7-10]。本研究中，硼替佐米作用于人红系白血病细胞株 TF-1 24 h 和 48 h 的 IC_{50} 分别为为 52、27 nmol/L 也证实了这一点。

综上所述，硼替佐米治疗白血病的靶点，研究最多的是 NF-KB 途径，尚缺乏新的分子生物学靶点。

Sall4 基因是新近发现的原癌基因，定位于人染色体的 20q13.12~q13.31，其编码的蛋白质属于锌指转录子[5]。

Sall4 基因可能是早期突变的癌基因，随着它在白血病中表达上调，使不具有自我更新能力的祖细胞获得自我更新的能力及恶性转化的倾向，从而转化为白血病干细胞。而对免疫缺陷的小鼠实验则证明当 Sall4 表达降低时白血病发病率也降低[5]。

国内外研究均发现，仅正常的 $CD34^+$的白血病干/祖细胞、急性 B 淋巴细胞白血病/淋巴瘤、AML、慢性髓系白血病可以检测到 Sall4 的表达，而 T 细胞系起源的白血病没有检测到[11-13]。

Yang 等[5]证明 Sall4 的可与多达 38 种靶基因结合，包括诱导凋亡基因（如 TNF、TP53）和抑制凋亡基因（如 Bmi-1、Bcl-2）。当 Sall4 基因表达水平下调时，对诱导凋亡的靶基因起正向调节作用，对抑制凋亡的靶基因起负向调节作用，最终促进细胞凋亡。

综上所述，证明 Sall4 基因在白血病细胞异常表达，其表达水平与 AML 的发生、发展密切相关。但是，药物针对 Sall4 基因靶向治疗的研究报道却鲜见。

在本研究中，我们选择能针对白血病干细胞进行靶向治疗的代表性药物——硼替佐米，并以 Sall4 基因为研究对象，观察到在人红系白血病细胞株 TF-1 上 Sall4 基因高表达；并且，在硼替佐米诱导 TF-1 细胞凋亡过程中，随着作用剂量和时间的增加，细胞凋亡率的增加，Sall4 mRNA 表达水平降低。这提示 Sall4 基因在硼替佐米诱导 TF-1 细胞凋亡过程中起到了一定作用，可能为硼替佐米治疗 AML，既NF-KB 活化途径之后的一个新靶点，丰富了硼替佐米治疗 AML 的作用机制，值得进一步探讨。

参 考 文 献

[1] Adams J.The development of proteasome inhibitors as anticancer drugs[J].Cancer Cell,2004,5(5):417-421.

[2] Bavi P,Uddin S,Ahmed M,et al.Bortezomib stabilizes mitotic cyclins and prevents cell cycle progression via inhibition of UBE2C in colorectal carcinoma[J].Am J Pathol,2011,178(5):2109-2120.

[3] Benevolo G,Larocca A,Gentile M,et al.The efficacy and safety of bortezomib and dexamethasone as a maintenance therapy in patients with multiple myeloma who are responsive to salvage bortezomib-containing regimens[J].Cancer,2011,117(9):1884-1890.

[4] Attar E C,De Angelo D J,Supko J G,et al.Phase Ⅰ and pharmacokinetic study of bortezomib in combination with idarubicinand cytarabine in patients with acute myelogenous leukemia[J].Clin Cancer Res,2008,14(5):1446-1454.

[5] Yang J,Chai L,Gao C,et al.SALL4 is a key regulator of survival and apoptosis in human leukemic cells[J].Blood,2008,112(3):805-813.

[6] Guzman M L,Swiderski C F,Howard D S,et al.Preferential induction of apoptosis for primary human leukemic stem cells[J].Proc Natl Acad Sci USA,2002,99(25):16220-16225.

[7] 扶云碧，孙启鑫，孟凡义，等.蛋白酶体抑制剂硼替佐米诱导髓系白血病细胞株 HL-60 凋亡的机制研究[J].中华医学杂志，2006，86(34):2413-2416.

[8] Yerlikaya A,Okur E,Eker S,et al.Combined effects of the proteasome inhibitor bortezomib and Hsp70 inhibitors on the B16F10 melanoma cell line[J].Mol Med Report,2010,3(2):333-339.

[9] Awasthi N,Schwarz M A,Schwarz R E,et al.Proteasome inhibition enhances antitumour effects of gemcitabine in experimental pancreatic cancer[J].HPB(Oxford),2009,11(7):600-605.

[10] Horton T M,Gannavarapu A,Blaney S M,et al.Bortezomib interactions with chemotherapy agents in acute leukemia in vitro[J].Cancer Chemother Pharmacol,2006,58(1):13-23.

[11] Yang J,Gao C,Chai L,et al.A novel SALL4/OCT4 transcriptional feedback network for pluripotency of embryonic stem cells[J].PLoS One,2010,5(5):e10766.

[12] Cui W,Kong N R,Ma Y,et al.Differential expression of the novel oncogene,SALL4,in lymphoma,plasma cell myeloma,and acute lymphoblastic leukemia[J].Mod Pathol,2006,19(12):1585-1592.

[13] 王 华，谭 荻，刘 芳，等.RT-PCR 法检测 SALL4 基因在白血病的表达[J].临床血液学杂志，2008，21(11):600-602.

（责任编辑：关蕴良）