重庆维普 http://www.cqvip.com

论 著 文章编号:0253-3626(2008)09-1071-05

hnRNP K shRNA 对 K562 细胞效应的初步研究

黄莲芬,冯文莉,罗宏伟,孙成铭

(重庆医科大学医学检验系 临床检验诊断学省部共建教育部重点实验室,重庆 400016)

【摘 要】目的:探索 RNA 结合蛋白 K(Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K,hnRNP K)shRNA 逆转录病毒对 K562 细胞的效应。方法:*Hind*Ⅲ/*Ecor* Ⅰ双酶切和测序鉴定 pSUPER retro hnRNP K shRNA 逆转录病毒载体,用包装得到的逆转录病毒感染 K562 细胞,G418 稳定筛选后,分别用流式细胞仪,MTT 实验,瑞氏染色,RT-PCR 分析细胞周期和细胞凋亡,细胞增殖,细胞形态学,hnRNP K 和真核细胞翻译起始因子 4E(Eukaryotic translation initiation factor-4E,eIF4E)mRNA 表达变化。结果:克隆载体序列正确。与空载对照组 K562 细胞相比,hnRNP K 干扰组 G_2/M 期细胞比例明显增多($P<0.05$),而细胞凋亡则没有显著变化($P>0.05$),细胞增殖能力降低,双核和多核细胞明显增多($P<0.05$),hnRNP K 和 eIF4E mRNA 表达较空载对照组分别降低了 55.22%和 55.27%。结论:hnRNP K 基因沉默能使 K562 细胞周期阻滞于 G_2/M 期,对细胞凋亡没有显著影响,降低细胞增殖能力,下调 eIF4E mRNA 表达,使双核和多核细胞增多,提示该基因可能与细胞分裂有关。

【关键词】RNA 结合蛋白 K;shRNA;逆转录病毒载体;真核细胞翻译起始因子 4E

【中国图书分类法分类号】R730.231;R733.7 【文献标识码】A 【收稿日期】2008-03-26

The effect of hnRNP K shRNA on K562 cells

HUANG Lian-fen, et al

(*Department of Laboratory Medicine, Key Laboratory of Laboratory Medical Diagnostics, Ministry of Education, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To explore the effect of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K(hnRNP K)short hairpin RNA(shRNA)on K562 cells. *Methods*: hnRNP K shRNA retrovirus was packaged with pSUPER retro hnRNP K shRNA after its identification by enzyme digestion and sequencing analysis, then FCM, Wright staining, MTT assay, RT-PCR were used to analyze its effects on cell cycle and apoptosis, proliferation, hnRNP K and eukaryotic translation initiation factor-4E(eIF4E) mRNA of K562 cells respectively. *Results*: The sequence of the inserted fragment in pSUPER retro hnRNP K shRNA was correct. Compared with the control K562 cells, hnRNP K shRNA treated group showed significantly more cells at G_2/M phase ($P<0.05$), growth inhibition and more cells with ≥2 nucleus($P<0.05$) as well as 55.22% and 55.27% decrease of hnRNP K and eIF4E mRNA respectively. *Conclusion*: hnRNP K interference blocks K562 cells at G_2/M phase, inhibits cell growth, and down-regulates both eIF4E and hnRNP K mRNA expression, increases cells with ≥2 nucleus, suggesting that it might play a role during cell division.

【Key words】 Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K; Short hairpin RNA; Retroviral vector; Eukaryotic translation initiation factor-4E

慢性粒细胞白血病(Chronic myelogenous leukemia,CML)是一种起源于造血干细胞的克隆性增殖性疾病,其特征性的 Ph 染色体和 bcr-abl 融合基因所编码的 BCR-ABL 融合蛋白具有异常的酪氨酸激酶活性,与 CML 的发病有关,该病病程可以从非致死性的慢性期向致死性的急变期转变,其机制尚不清楚。已知 CML 急变时,hnRNP K 表达明显升高[1],而它在 Hela 细胞中通过转录水平升高 eIF4E 表达而诱导恶性表型发生[2]。因此,我们运用了能表达 hnRNP K shRNA 的逆转录病毒载体,研究 hnRNP K 基因沉默对 K562 细胞周期和细胞凋亡,细胞增殖,细胞形态学的影响,并用 RT-PCR 分析 hnRNP K 和 eIF4E mRNA 表达变化,旨在进一步阐明 hnRNP K 在 CML 急变中的作用及其机理。

作者介绍:黄莲芬(1982-),女,硕士,
研究方向:白血病致病机理和基因治疗。

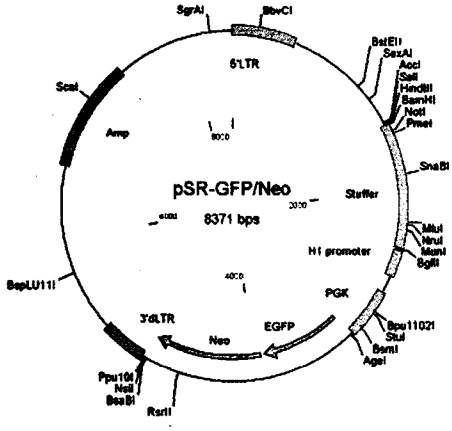
通讯作者:冯文莉,女,教授,E-mail:fengwlcqmu@sina.com。

重庆维普 http://www.cqvip.com

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 质粒,菌株和细胞 逆转录病毒空载体 pSUPER retro neo+GFP(见图 1),逆转录病毒克隆载体 pSUPER retro hnRNP K shRNA1(含有 5'-TGGTGAATTTGGTAAACGC-3')



注:本研究选用美国 Oligoengine 公司的 pSUPER retro neo+gfp 逆转录病毒载体,它含有 RNA 聚合酶 Ⅲ H1 启动子,可转录产生针对靶序列的 shRNA;报告基因为绿色荧光蛋白基因(gfp 基因)和新霉素抗性基因(neo 基因),可用于阳性克隆的筛选。逆转录病毒骨架携带能表达的 shRNA 的序列(60 bp 寡核苷酸链),随着病毒的包装,感染,整合到靶细胞中,在 H1 启动子作用下,可以持续表达 shRNA。该载体有 *Bgl* Ⅱ和 *Hind* Ⅲ两个酶切位点,两位点之间为 983bp 的填充序列,将该填充序列切下后,与合成的具有 *Bgl* Ⅱ和 *Hind* Ⅲ粘性末端的 60nt 的寡核苷双链连接,构成重组质粒。该载体在插入片段的两侧分别有 *EcoR* Ⅰ和 *Hind* Ⅲ的酶切位点,这两个位点之间的片段长为 1 204 bp,空载体和构建的重组质粒阳性克隆 *EcoR* Ⅰ/*Hind* Ⅲ 双酶切可分别得到 1 204bp 和 281bp 条带。

图 1 pSUPER retro neo+GFP 逆转录病毒载体

和 pSUPER retro hnRNP K shRNA2(含有 5'-TGCTTAAATTA CCAACATT-3')均由美国 Danilo perrotti 教授惠赠。大肠杆菌 DH5α 感受态细菌,PT67 包装细胞株,K562 细胞株由本课题组提供。

1.1.2 主要试剂 质粒抽提试剂盒购自 Qiagen 公司,限制性内切酶 *Hind* Ⅲ,*Ecor* Ⅰ,DNA Marker DL 2000, DL-15000 等购自宝生物工程有限公司,转染试剂 Transfast™ 购自 Promega 公司。G418 购自 Invitrogen 公司,胎牛血清购自杭州四季青公司,Annexin V-PE 试剂为 Bender 公司产品。

PCR 引物设计:根据人 eIF4E mRNA 序列(NM_001968)以及 hnRNP K mRNA 序列(NM_002140,NM_031262,NM_031263),利用 Primer Premier 5 软件自行设计 PCR 引物,由上海生物工程技术有限公司合成。eIF4E 引物,P1:5'-ACGGAATCTAATCAGGAGGT-3',P2:5'-TTCCCACATAGGCTCAATAC-3',产物长度 246bp。hnRNP K 引物,P1:5'-CCCGATAGGGTTGTAGAGTG-3',P2:5'-ATTGCAGAGTCCCAAGTTTC-3',产物长度 452bp。β-actin 引物,P1:5'-GTGGACATCCGCAAAGAC-3',P2:5'-AAAGGGTGTAACGCAACTA A-3',产物长度 302bp。

1.2 实验方法

1.2.1 质粒酶切和测序鉴定 将干扰载体(pSUPER retro hnRNP K shRNA)和空载体(pSUPER retro neo+GFP)分别转化至大肠杆菌 DH5α 感受态细菌,经 Amp 抗性筛选后挑取单个克隆增菌,用华舜质粒提取试剂盒按说明书提取质粒,用 *Hind* Ⅲ/*Ecor* Ⅰ限制性酶双酶切 2h 后,产物用 2%琼脂糖凝胶电泳鉴定,同时,质粒送上海英俊生物技术有限公司测序鉴定。

1.2.2 逆转录病毒包装,感染和稳定筛选 常规培养 PT67 细胞,待其长到对数增长期,于转染前 1d 铺板,转染时换用无血清 DMEM,将干扰载体和空载体用 Transfast™ 脂质体分别转染至该细胞,转染后 24h 用胰酶消化,1∶20 传代,加入新鲜培养基,48h 后换用含 500μg/ml G418 的选择培养基筛选包装细胞约 7~10d 后,在倒置荧光显微镜下标记,挑取绿色荧光克隆,用含 200μg/ml G418 的培养基扩增,建立逆转录病毒稳定包装细胞株,收集其培养上清,用于感染 K562 细胞,感染时加入 polybrene 使其终浓度为 4μg/ml,感染后 24h,用含 800μg/ml G418 的选择培养基筛选一段时间后,换用含 200μg/ml G418 的培养基维持培养和扩增,得到干扰组和空载对照组 K562 细胞。

1.2.3 流式细胞仪检测细胞周期 离心收集 1×10^6 个干扰组,空载对照组和未处理组 K562 细胞,用预冷的 PBS 缓冲液洗涤细胞 2 次后,用 1ml 预冷的 70%乙醇重悬细胞,4℃固定 12h 以上。PBS 洗涤去乙醇,1 000r/min,5min, 洗 2 遍,0.5ml PBS 重悬细胞,加入 PI 和 RNase A 至终浓度 50μg/ml,37℃温浴 30min,用流式细胞仪(FACScan,美国 BD 公司)测定周期。

1.2.4 流式细胞仪检测细胞凋亡 同上收集并洗涤各组 K562 细胞,用 1×Binding Buffer 制成 1×10^6 个细胞/ml 的悬液,加入 5μl Annexin V-PE 及 10μl 的核酸染料 7-AAD,轻轻混匀,室温避光放置 20min,加入 200μl 1×Binding Buffer,立即上流式细胞仪(FACScan,美国BD 公司)检测。

1.2.5 MTT 试验检测细胞增殖 取适量干扰组和空载组 K562 细胞,分别用含 G418 200μg/ml 的 1640 培养基稀释到 1×10^4 个/ml,加到 96 孔培养板中,每孔 200μl,每组设 3 个平行孔,另设只加培养基的空白对照,分别于 37℃ 5% CO_2 饱和湿度孵箱培养 1d,2d,3d,4d 后,分别加入新鲜配制的四甲基偶氮唑蓝(MTT,用 PBS 配成 5g/L 浓度,0.22μm 过滤除菌后使用),20μl/孔,再放回细胞培养孵箱培养 4h 后,离心后轻轻拍干培养板各孔液体,每孔加 DMSO 150μl 充分溶解结晶物,用酶标仪(波长 494nm)测定各孔的吸光度(A)值,以

重庆维普 http://www.cqvip.com

每组各孔 A 值的平均值减去空白对照孔 A 值平均值作为各组的平均 A 值。以每天各组各孔吸光度均值为纵坐标，时间为横坐标，绘制细胞生长曲线。

1.2.6 瑞氏染色检测细胞形态学 取 1ml 培养的各组 K562 细胞，用牛鲍氏血细胞计数板计数后，调整细胞悬液浓度到（$5\times10^5\sim1\times10^6$）个 /ml，每张片子用 100～200μl 细胞悬液，用离心涂片机甩片后取出玻片，自然晾干后滴加 2～3 滴瑞氏染液，稍等片刻后逐滴加瑞氏缓冲（pH6.4～6.8），轻轻吹匀后置于室温染色 10min，用自来水持续冲洗 3min，自然干燥后于倒置显微镜下观察。

1.2.7 RT-PCR 检测 hnRNP K 和 eIF4E mRNA 表达 Trizol 法提取各组 K562 细胞总 RNA，紫外分光光度计测定纯度并定量后，每 20μl 逆转录反应体系用总 RNA 1μg，按照 TaKaRa 的 M-MLV 逆转录试剂盒说明书操作，将总 RNA 逆转录成 cDNA，-20℃保存备用。PCR 扩增采用 20μl 体系，内含 2μl cDNA，10pmol 引物，2μl 10×PCR 缓冲液，1.6μl 25mmol/L $MgCl_2$，2μl 2.5μmol/L dNTP，Taq 酶 0.5U。eIF4E 基因扩增条件为：94℃ 预变性 5min，再 94℃ 20s、60℃ 40s、72℃ 20s 5 个循环后，再 94℃ 20s、56℃ 40s、72℃ 20s 25 个循环，最后 72℃ 延伸 10min，β-actin 基因扩增条件为：94℃ 预变性 5min，94℃ 20s、56℃ 40s、72℃ 20s 28 个循环，72℃ 延伸 10min，hnRNP K 基因扩增条件为：94℃ 预变性 5min，94℃ 20s、56℃ 40s、72℃ 20s 29 个循环，72℃ 延伸 10min。扩增产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳，在 Bio-Rad 凝胶成像仪上观察分析。以 β-actin 基因为内对照，计算各处理组 K562 细胞目的基因相对于 β-actin 基因电泳条带灰度值之比 R，R 值可以反映各组 eIF4E 和 hnRNP K mRNA 相对表达丰度。

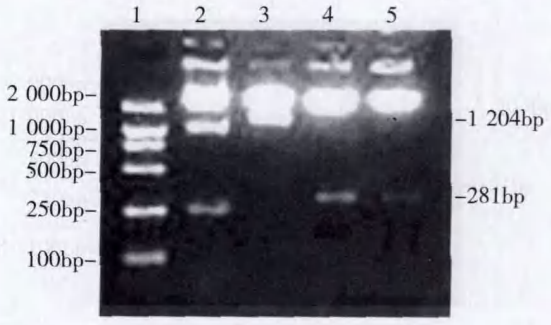
1.3 统计学方法

用 SPSS 11.5 统计学软件进行单因素方差分析和多个样本均数与正常对照组均数比较的 *Dunnett-t* 检验，以及两样本均数的 *t* 检验，以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 质粒酶切和测序鉴定

酶切鉴定电泳结果显示，空载体双酶切后可得 1 204bp 片断（见图 2），而干扰载体 *Hind*Ⅲ/*Ecor* Ⅰ双酶切可得 281bp 片断（见图 2），说明载体克隆成功。测序鉴定结果表明，干扰载体插入片断序列正确。

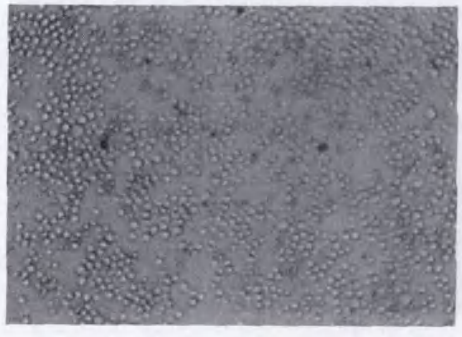


1. DL2000 marker；2. DL15000 marker；3. 空载体；4. 干扰载体 1；5. 干扰载体 2

图 2 逆转录病毒载体 *Hind*Ⅲ/*Ecor* Ⅰ双酶切鉴定



A.荧光×400



B.可见光×400

图 3 逆转录病毒感染 K562 细胞 G418 稳定筛选后

2.2 逆转录病毒包装，感染及稳定筛选

成功获取逆转录病毒稳定包装细胞株，收集得到的逆转录病毒感染 K562 细胞并经 G418 稳定筛选后，在倒置荧光显微镜下观察并照相，发现筛选后近 100%K562 细胞都发绿色荧光，说明筛选后细胞均表达绿色荧光蛋白（见图 3）。

2.3 细胞周期变化

流式细胞仪检测各组 K562 细胞周期变化，结果表明，hnRNP K shRNA1 和 hnRNP K shRNA2 干扰组 K562 细胞 G_2/M 期细胞比例与正常对照组和空载对照组相比均明显增加，差异均有统计学意义（见表 1）。

2.4 细胞凋亡变化

流式细胞仪检测各组 K562 细胞凋亡变化，结果表明，hnRNP K shRNA1 和 hnRNP K shRNA2

重庆维普 http://www.cqvip.com

表 1 FCM 检测各处理组 K562 细胞周期和细胞凋亡变化

分组	细胞周期($\bar{x}\pm s$)			细胞凋亡($\bar{x}\pm s$)
	G_0/G_1	S	G_2	
正常对照组	36.23 ± 0.15	52.52 ± 0.28	11.14 ± 0.01	2.84 ± 0.06
空载对照组	30.79 ± 0.13	53.86 ± 0.08	15.35 ± 0.04	5.57 ± 0.04
hnRNP K shRNA1	31.09 ± 0.15	44.41 ± 0.21	24.51 ± 0.06*▼	5.66 ± 0.11◆▲
hnRNP K shRNA2	27.04 ± 0.16	45.03 ± 0.10	27.58 ± 0.06*▼	5.55 ± 0.07◆▲

*:$P<0.05$,与正常对照组比较;▼:$P<0.05$, 与空载对照组比较;◆:$P>0.05$,与正常对照组比较;▲:$P<0.05$,与空载对照组比较。

干扰组 K562 细胞凋亡比例与空载对照组相比,差异无统计学意义(见表 1)。

2.5 细胞增殖变化

MTT 实验检测各组 K562 细胞增殖能力变化,每时间点吸光度值取 3 次平行实验的均值,以时间为横坐标,对应吸光度值均值为纵坐标,绘制细胞生长曲线图。由图 4 可见,hnRNP K shRNA1 和 hnRNP K shRNA 2 干扰组细胞增殖能力较空载对照组明显降低。

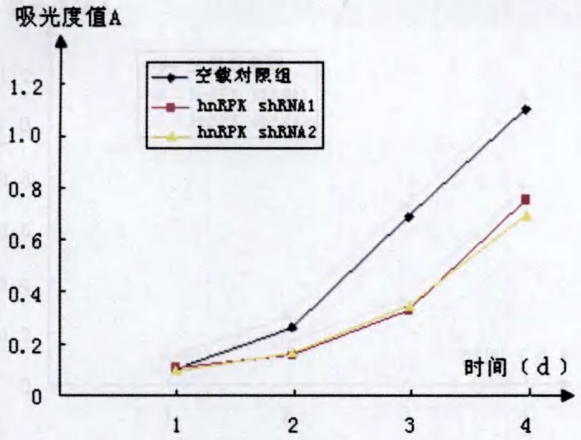


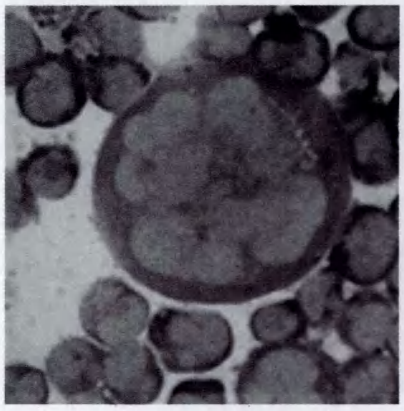
图 4 hnRNP K shRNA 对 K562 细胞增殖能力影响

2.6 细胞形态学变化

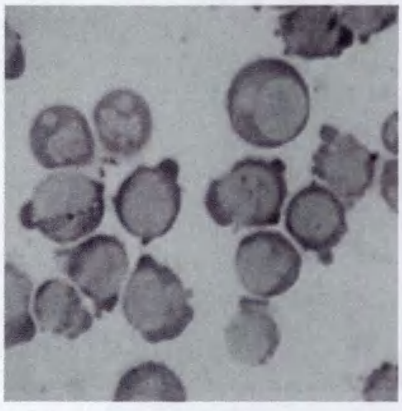
瑞氏染色后,普通倒置显微镜下观察发现, hnRNP K 基因干扰组(图 5/A)大核细胞明显增多,增长速度缓慢,瑞氏染色后发现,这些大核细胞多数含有 4 个以上的细胞核,有可能是细胞有丝分裂异常所致。通过粗略计数瑞氏染色后镜下 1 000 个细胞,结果显示,hnRNP K 干扰组(2 个及以上核)的数目比例占(5.50 ± 0.98)%,这部分细胞多数多于 2 个核,而正常对照组(图 5/B) 多个核的大细胞仅有(0.80 ± 0.21)%,且多数为 2 个核,很少见到多个核的细胞出现, 两者差异具有统计学意义($P<0.05$)。

2.7 eIF4E 和 hnRNP K mRNA 表达变化

各处理组 K562 细胞 eIF4E 和 hnRNP K 基因 RT-PCR 电泳结果见图 6。分析得各组 k562 细胞



A.干扰组 × 800

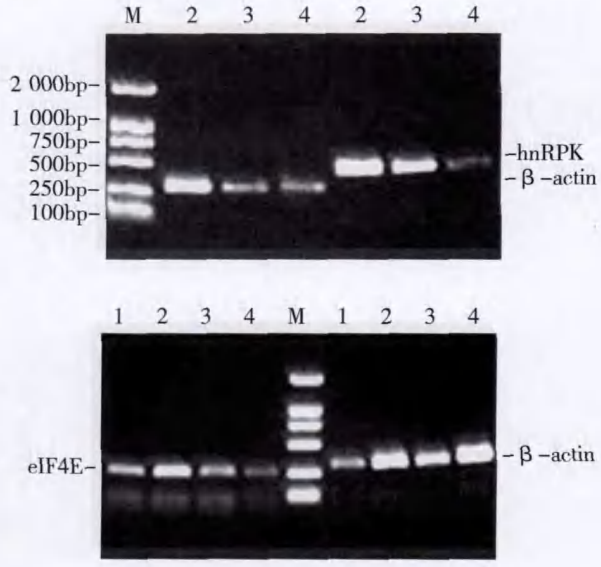


B.空载体对照组 × 800

图 5 hnRNP K shRNA 对 K562 细胞形态学的影响

hnRNP K 基因 R 值分别为:干扰组 0.79,空载对照组 1.77,未处理组 1.32,各处理组 eIF4E 基因 R 值分别为:干扰组 0.24,空载对照组 0.54,1 正常对照组 0.69,2 正常对照组 0.51。分析结果显示,干扰组 hnRNP K mRNA 表达较空载对照组降低了55.22%,而 eIF4E mRNA 表达较空载对照组降低55.27%。

重庆维普 http://www.cqvip.com



1 和 2. 分别为 1 和 2 正常对照组;3. 空载对照组;4. 干扰组; M. DL2000

图 6 eIF4E 和 hnRNP K 基因 RT-PCR 电泳图

3 讨 论

hnRNP K 是一个多聚 C 结合 hnRNP,已报道可调节 mRNA 转录,运输和翻译,亦以序列特定方式与 DNA 结合[3]。在细胞转化和癌症细胞中,hnRNP K 蛋白表达量增强,其表达水平调节参与促有丝分裂基因和肿瘤发生基因的表达,它可能是病毒和肿瘤治疗的靶标[3]。在表达 BCR/ABL 的髓系 / 淋巴系和原始 CML-BC 而非 CML-CP 造血祖细胞中,以BCR/ABL 依赖方式通过 MAPK/ERK 通路增强 hnRNP K 转录及其 mRNA 稳定性[1],从而升高其表达水平,而 hnRNP K 在 Hela 细胞中对 eIF4E 基因表达的调控促进了肿瘤发生[2]。eIF4E 在帽依赖翻译中起重要作用,表达升高可以促进与细胞生长分化有关的弱 mRNA 的表达[4],近年来的研究表明它亦参与控制细胞周期进展和细胞增殖[5],在乳腺癌等多种肿瘤中明显表达升高,并与肿瘤的预后和转移相关,CML 慢性期晚期和急变期,其表达水平和磷酸化以 BCR/ABL 依赖方式升高。

我们前期的实验检测了 K562 细胞以及 20 多例 CML 患者骨髓中 eIF4E 基因 mRNA 表达,发现 K562 细胞以及 CML 急变期而非慢性期病人骨髓较贫血对照骨髓 eIF4E mRNA 表达显著升高,hnRNP K mRNA 与 eIF4E mRNA 表达呈线性正相关,这支持了 CML 细胞中 hnRNP K 能调节 eIF4E mRNA 表达的猜测。本文研究发现,hnRNP K shRNA 使 K562 细胞周期阻滞于 G_2/M 期,抑制 K562 细胞的增殖能力,而瑞氏染色发现 hnRNP K 干扰组 K562 细胞比空载对照组细胞双核和多核细胞明显增多。hnRNP K 参与调节促有丝分裂基因的表达,而 eIF4E 能调节一系列参与细胞分裂蛋白的合成速度[2],hnRNP K 基因沉默后细胞体积增大的具体深入机制需要进一步研究。另外,hnRNP K shRNA 使 K562 细胞 eIF4E mRNA 表达明显降低,提示 hnRNP K 基因沉默能够下调 eIF4E mRNA 表达。hnRNP K 和 eIF4E 两者都可以在翻译水平调节一些基因的表达,前者通过与内部核糖体进入位点 (Internal ribosome entry site, IRES)元件以及分化控制元件(Differentiation control element, DICE)元件结合,参与调节 mRNA 剪切,运输,加工和翻译效率,而 eIF4E 除了参与调节帽依赖翻译以外,还可以调节 Cylin D3 的翻译[6],以及Cylin D1 的核浆运输[7]。以上提示我们,CML 急变期而非慢性期,hnRNP K 和 eIF4E 表达升高可能具有进一步研究意义,为我们进一步探索 CML 急变机理和寻找新的治疗靶标提供方向。

参 考 文 献

[1] Notari M, Neviani P, Perrotti D. A MAPK/HNRNP K pathway controls BCR/ABL oncogenic potential by regulating MYC mRNA translation[J]. Blood, 2006; 107(6): 2507-2516.

[2] Lynch M, Li C, Michael J. hnRNP k binds a core polypyrimidine element in the eukaryotic translation initiation factor 4E (eIF4E) promoter, and its regulation of eIF4E contributes to neoplastic transformation[J]. Mol Cell Biol, 2005; 25(15): 6436-6453.

[3] Leopoldino AM, Carregaro F, Silva CH, et al. Sequence and transcriptional study of HNRNP K pseudogenes, and expression and molecular modeling analysis of hnRNP K isoforms[J]. Genome, 2007; 50(5): 451-462.

[4] De BenedettiA, Graff JR. eIF4E expression and its role in malignancies and metastases[J]. Oncogene, 2004; 23(18): 3189-3199.

[5] Culjkovic B, Topisirovic I, Borden KL. Controlling gene expression through RNA regulons: the role of the eukaryotic translation initiation factor eIF4E[J]. Cell Cycle, 2007; 6(1): 65-69.

[6] Prabhu S, Saadat D, Zhang M. A novel mechanism for Bcr-Abl action: Bcr-Abl-mediated induction of the eIF4F translation initiation

(下转第 1147 页)

重庆维普 http://www.cqvip.com

对 GFR 较低侧;(2)选择肾动脉分支较少侧;(3)上述两点无明显差异时,根据实际情况(如有无腹腔手术史)和医师经验决定。本组 3 例选择左肾,5 例选择右肾,手术均顺利。分离右肾静脉时,可适当靠近下腔静脉切断肾静脉以保证肾静脉长度。

3.3 取肾手术方式选择

我们认为经腹手术血管暴露好,操作方便,同时由于大血管下腔静脉暴露充分,可避免下腔静脉撕裂出血发生,本组 8 例下腔静脉均处理良好,无出血发生。而经腰手术时血管暴露欠佳,易导致并发症出现,而腹腔镜取肾技术要求较高,延长了供肾热缺血时间,对供肾有不同程度的挤压损伤,且血管条件不甚满意。经腹腔开放手术的主要并发症有创伤较大,术后切口感染,术后肠粘连等,本组资料术后加强护理检测,供者尽早下床活动,除 1 例术后切口脂肪液化外,未出现其他并发症。

3.4 亲属活体肾移植优点

亲属活体肾移植供受配型优于尸体供肾,排斥反应发生率低[6],远期疗效好,人肾存活率明显提高[7];由于为择期手术,故供、受者有充分的术前准备,对供肾及患者情况有清楚的了解,可减少各并发症;术中可保证供缺血时间尤其是冷缺血时间短,供肾质量明显优于尸肾;减少受体透析时间和节省经费,避免长期透析带来的各种并发症;受体对新肾倍感珍惜,加深亲情等。

参 考 文 献

[1] Rosendale JD,Mc Bride MA. Organ donation in the nited States:1990~1999. In:Clinical Transplants 2000[M]. Los Angeles:CLA immnogenetics Center,2001.85-97.

[2] 金 昊,昌 盛.亲属活体肾移植的发展和现状[J].中华器官移植杂志,2006;27(5):318-320.

[3] De La Vega LS,Torres A,Bohorqez HE,et al. Patient and graft otcomes from older living kidney donors are similar to those from yonger donors despite lower GFR[J]. Kidney Int,2004;66(4):1654-1661.

[4] Gnnela N,Annette L,Gdrn N. Low absolte glomrlar filtration rate in the living kindney donor[J]. Transplantation,2000;70(9):1360-1362.

[5] 李新长,孟栋良,龙成美,等.活体亲属肾移植 11 例报告[J]. 实用临床医学,2007;8(1):55-59.

[6] Tejani A,Emmett L.Acte and chronic rejection[J]. SeminNephrol,2001;21(2):498-507.

[7] Konig P.Living donation-selection criteria,preparation and follow-up[J]. Acta Medic Astriaca,2001;28(1):70-73.

[8] Gabolde M,Moulin AM. Evaluation,selection, and follow-up of live kidney donors:a review of current practice in French kidney transplant centres[J]. Nephrol Dial Transplant,2001;16(7):2048-2052.

(责任编辑:谭乐勤)

(上接第 1075 页)

complex and mRNA translation[J]. Oncogene,2007;26(8):1188-1200.

[7] Topisirovic I,Guzman ML,McConnell MJ,et al. Aberrant eukaryotic translation initiation factor 4E-dependent mRNA transport impedes hematopoietic differentiation and contributes to leukemogenesis [J]. Mol Cell Biol,2003;23(24):8992-9002.

(责任编辑:关蕴良)

(上接第 1144 页)

别仍有待进一步研究。

参 考 文 献

[1] 赵文光,王 征,王嘉桔,等.血栓闭塞性脉管炎的研究现状[J]. 中华普通外科杂志,2002;17(5):319-320.

[2] 代远斌,张 宏,向 志,等.经电视腹腔镜腰交感神经节切除术治疗 Buerger 病[J]. 重庆医科大学学报,2004;29(6):829-831.

[3] 时 德,张依仁,白麟祥,等.静脉动脉化治疗下肢慢性缺血 43 例报告[J]. 实用外科杂志,1992;12(1):20-21.

[4] 代远斌,卢小刚.经电视腹腔镜腰交感神经节切除术的并发症及防治[J]. 重庆医科大学学报,2005;30(6):912-914.

[5] 林勇杰,吕伟明,谭 最.血栓闭塞性脉管炎外科治疗几种术式疗效评价[J]. 中国实用外科杂志,1998;18(4):533-535.

(责任编辑:关蕴良)