

峰形及分离度较好,所以 B 相 pH 值选择 5.0。

4. 检测波长的选择:经二极管阵列检测器,在 190~400nm 波长检测,得到三维光谱图。结果显示 280nm 层析峰形较好,出峰数目较多,各层析峰之间分离度较好,故选择 280nm 作为检测波长。

5. 相似度评价:从表 5 相似度结果来看,13 批延胡索药材指纹图谱与对照指纹图谱的相似度,除 13 号样品外,其余都高于 0.95,表明该 13 批延胡索样品的共有特征峰基本保留,相似度良好。

本实验建立了延胡索药材的 HPLC 指纹谱的测定方法,实验方法简便,重复性好,得到延胡索药材 HPLC 指纹图谱及相关数据,为延胡索药材及其他含延胡索的中药复方制剂制定质量标准提供参考。

参考文献

- 1 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[M]. 北京: 化学工业出版社, 2010: 130
- 2 浙江植物志编辑委员会. 浙江植物志(总论)[M]. 杭州: 浙江科学技术出版社, 1993: 256

- 3 贺凯, 高建莉, 赵光树. 延胡索化学成分、药理作用及质量控制研究进展[J]. 中草药, 2007, 38(12): 1909-1912
- 4 谢培山. 中药色谱指纹图谱[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2005: 10
- 5 周玉新, 等. 中药指纹图谱研究技术[M]. 北京: 化学工业出版社, 2002: 131
- 6 窦志英, 孙巍, 张敏, 等. 陕西产延胡索药材 HPLC 指纹图谱研究[J]. 天津中医药大学学报, 2007, 26(3): 150-153
- 7 游修琪, 顾雪竹, 毛淑杰, 等. 延胡索产地不同加工品 HPLC 指纹图谱研究[J]. 中成药, 2009, 31(10): 1481-1484
- 8 刘梅汤, 树良, 张文惠. HPLC 色谱指纹图谱鉴别夏天无和延胡索药材[J]. 中药材, 2003, 26(9): 629-631
- 9 施菁, 王炜, 陈柳蓉. 白花土元胡药材的高效液相色谱法指纹图谱研究[J]. 医药导报, 2008, 27(9): 1108-1110
- 10 李先端, 马志静, 毛淑杰. 不同品种醋制延胡索指纹图谱的比较研究[J]. 中药材, 2007, 30(2): 144-146
- 11 程星辉, 石钺. 延胡索抗心肌缺血活性部位指纹图谱中化学成分分析[J]. 中国中药杂志, 2008, 33(14): 1717-1719

(收稿: 2011-02-18)

(修回: 2011-03-04)

急性髓系白血病干细胞免疫表型和信号通路蛋白活化检测及意义

郑 瑞 陈葆国 千灵红 章卫国

摘 要 目的 为了解急性髓系白血病干细胞(AML-LSCs)免疫表型特点和信号转导通路活化状态,以探讨其生物学特征。**方法** 应用流式细胞术检测(AML-LSCs)免疫表型、P-gp、PTEN、p-Akt、p-ERK 的表达,以正常造血干细胞(HSCs)为对照。**结果** 正常 HSCs 主要免疫表型:CD34⁺、CD38⁻、CD123⁻、CD96⁻、CD117⁺、CD44⁺、CD33⁻、CD13⁻。PTEN 蛋白阳性率为 72.09%, p-Akt 及 p-ERK 蛋白均阴性, P-gp 蛋白阴性。AML-LSCs 主要免疫表型:CD123⁺、CD96⁺、CD117⁻、CD44⁺、CD13⁺、CD33⁺,与 HSCs 免疫表型差异主要为 CD123⁺、CD96⁺、CD117⁻、CD13⁺、CD33⁺。LSCs PTEN 蛋白阳性率为 25.58%,低于正常 HSCs($\chi^2 = 30.88, P < 0.01$), p-Akt 阳性率为 63.95%, p-ERK 阳性率为 70.93%,高于正常 HSCs($\chi^2 = 24.43, 30.87, P$ 均 < 0.01)。P-gp 蛋白阳性率为 67.44%。79 例 AML 患者预后分析表明,高 AML-LSCs 的患者较低 AML-LSCs 患者复发率增高($\chi^2 = 5.69, P < 0.05$);无病生存率(DFS)分析显示,高 AML-LSCs 的患者无病生存时间中位数 14 个月,较低 AML-LSCs 患者无病生存时间中位数 28 个月明显缩短($P < 0.01$)。**结论** LSCs 免疫表型特征为 CD34⁺、CD38⁻、CD123⁺、CD96⁺、CD117⁻, P-gp 高表达。AML-LSCs 数量高的 AML 患者复发率高、无病生存时间短、预后差。MEK/ERK, PI₃K/PTEN/Akt 信号通路被激活,可能与 LSCs 克隆性增殖和自我更新有关。

关键词 急性髓系白血病 白血病干细胞 免疫表型 p-Akt p-ERK

Clinical Significance of the Immunophenotype and Signal Transduction Protein in Acute Myeloid Leukemia Leukemic Stem Cells. Zheng Rui, Chen Baoguo, Gan Linghong, Zhang Weiguo. Central Laboratory of Affiliated Taizhou Hospital, Wenzhou Medical College, Zhejiang 317000, China

基金项目:台州市“211 人才工程”基金资助项目[台人专(2009)236 号]

作者单位:317000 临海,温州医学院附属台州医院中心实验室

通讯作者:陈葆国,副主任医师,电子信箱:baoguo.chen@126.com

Abstract Objective To investigate the characteristics of the immunophenotype and the status of signal transduction proteins in acute myeloid leukemia leukemic stem cells (AML - LSCs). **Methods** Immunophenotype and P - gp, PTEN, p - Akt, p - ERK of the AML - LSCs were analyzed by flow cytometry. Normal hematopoietic stem cells (HSCs) were taken as the normal control. **Results** The immunophenotype for the HSCs were CD34⁺, CD38⁻, CD123⁻, CD96⁻, CD117⁺, CD44⁺·CD33⁻ and CD13⁻. 72.09% of the HSCs was found to be PTEN positive, while p - Akt, p - ERK and P - gp was absent in HSCs. The major immunophenotype for the AML - LSCs were CD123⁺, CD96⁺, CD117⁻, CD44⁺, CD13⁺ and CD33⁺. Compared to the HSCs, the characteristic phenotype for the AML - LSCs were CD123⁺, CD96⁺, CD117⁻, CD13⁺ and CD33⁺. The percentage of PTEN was significantly lower in AML - LSCs (25.58%) than that of the HSCs ($\chi^2 = 30.8$, $P < 0.01$). The expression of p - Akt (64.0%; $\chi^2 = 24.43$, $P < 0.01$) and p - ERK (70.9%; $\chi^2 = 30.87$, $P < 0.01$) was significantly higher in AML - LSCs than in HSCs. Furthermore, P - gp expression was observed in 67.44% patients. Among 79 AML patients, the relapse rate in patients with high AML - LSCs proportions was markedly increased than in those with low AML - LSCs proportions ($\chi^2 = 5.69$, $P < 0.05$), and the disease - free survival (DFS) was significantly decreased in patients with high AML - LSCs percentage than in those with low AML - LSCs percentage (median: 14 months vs 28 months, $P < 0.01$). **Conclusion** The characteristic immunophenotype for the AML - LSCs were CD34⁺, CD38⁻, CD123⁺, CD96⁺, CD117⁻, and P - gp protein positive. Patients with high AML - LSCs percentage were associated with high relapse rate, decreased DSF. Furthermore, the activation of the MEK/ERK, PI₃K/PTEN/Akt signal transduction pathway might be involved in the clonal proliferation and self - renewing for the LSCs.

Key words Acute myeloid leukemia; Leukemic stem cells; Immunophenotype; p - Akt; p - ERK

Kondo 等^[1]应用单克隆抗体证实正常造血系统各系列细胞及处于分化不同阶段的细胞都存在特异的免疫表型,恶性造血细胞存在分化阻滞现象,在分化特定阶段表现出异常的表型。随着多参数流式细胞术荧光标记细胞分选技术的应用,不但可以鉴别白血病干细胞(leukaemia stem cells, LSCs)而且能够快速分析、分选 LSCs。自从 2000 年 Jordan 等^[2]发现 CD123 在 LSCs 上高表达,提示 CD34⁺CD38⁻CD123⁺可能是 LSCs 特异性免疫标志后,LSCs 的研究取得迅速进展^[3]。为了深入探讨 AML 干细胞的生物学特征,本研究应用流式细胞术检测 AML 患者 LSCs 免疫表型及 P - gp、PTEN、p - Akt 和 p - ERK 的表达情况。

材料与方法

1. 材料:(1)研究对象:自 2007 年 1 月~2010 年 4 月笔者医院确诊的 86 例(除急性早幼粒细胞白血病)AML 患者,按 FAB 标准分别为:M0 4 例、M1 9 例、M2 36 例、M4 18 例、M5 14 例、M6 5 例;中位年龄 38(15~74)岁。初诊骨髓原始细胞 33%~96%。18 份正常对照是骨髓移植供者和体检者的样本,男性 12 名,女性 6 名,年龄 22~43 岁。化疗方案:DA、HA 等。白血病细胞系 Raji 和 Jurkat 由上海市免疫所惠赠。(2)主要试剂:1)小鼠 IgG1 - (PE、FITC、Percep 或 APC)、CD34 - APC、CD38 - Percep、CD33 - FITC、P - gp - FITC、CD117 - FITC、CD123 - PE、CD96 - FITC、CD13 - FITC、CD15 - FITC、CD11b - FITC、CD64 - FITC、CD14 - FITC、CD20 - FITC、CD22 - FITC、CD3 - FITC、CD7 - FITC、CD5 - FITC、CD2 - FITC 购自美国 BD 公司。CD44 - FITC 购自美国 eBioscience 公司。PTEN - Alexa488、磷酸化 Akt (p - Akt) Alexa488、磷

酸化 ERK1/2 (T202/Y204) (p - ERK) Alexa488 抗体购自美国 Cell Signaling Technology 公司。固定剂(Fix buffer)、细胞膜通透剂(Prem Buffer)购自美国 CALTAG 公司。(3)主要仪器:流式细胞仪 FACS CaliburTM为美国 BD 公司产品。

2. 方法:(1)标本:化疗前采骨髓 2~5ml 肝素钠抗凝,常规分离单个核细胞(MNC),用磷酸盐缓冲液制成细胞浓度为 1×10^7 /ml 的单细胞悬液备用。(2)细胞培养:Raji 和 Jurkat 接种于含 10% 灭活小牛血清的 RPMI 1640 培养液中,于 37℃、5% CO₂、饱和湿度下培养,每 2~3 天换液,取对数生长期的细胞进行实验。(3)单克隆抗体标记及流式分析:正常对照用 CD34 - APC/CD38 - Percep 设 CD34⁺CD38⁻细胞门。病例样本均用 CD34 - APC/CD38 - Percep/CD123 - PE 设 CD34⁺CD38⁻CD123⁺细胞门。然后再分析 CD96、CD117、P - gp、CD44、CD33、CD13、CD11b、CD15、CD64、CD14、CD20、CD22、CD7、CD3、CD5、CD2 等抗原表达。PTEN、p - Akt 和 p - ERK 检测:首先以 CD34/CD38 或 CD34/CD38/CD123 抗体标记单个核细胞膜,再固定、破膜,胞质内染色 PTEN、p - Akt 和 p - ERK。Raji 和 Jurkat 细胞系直接行胞质内 PTEN、p - Akt 和 p - ERK1/2 抗体染色。染色和检测方法按试剂说明书及文献[4,5]进行。用流式细胞仪和 Cell Quest 软件获取并分析 30000~400000 个骨髓单个核细胞。结果:PTEN、p - Akt 和 p - ERK 用平均荧光强度(MFI)和百分率表示,以 $\geq 5.00\%$ 为阳性。P - gp 用百分率表示,以 $\geq 10.00\%$ 为阳性。其余抗原用百分率表示,以 $\geq 20.00\%$ 为阳性。

3. 统计学方法:应用 SPSS 13.0 软件包进行分析。计数资料用 χ^2 检验析,计量资料呈偏态分布,用[中位数 M(最小值~最大值)]表示,进行秩和检验。AML 患者无病生存率(DFS)比较采用 Kaplan - Meier 生存分析和 Log - rank 检验。DFS 时间自获得缓解到复发为止。

结 果

1. 正常骨髓造血干细胞的免疫表型: CD34⁺CD38⁻细胞 (HSCs) CD117、CD44 均阳性。CD123、CD96、HLA - DR、CD71、CD33、CD13 均阴性。髓系较成熟阶段的抗原 CD64、CD14、CD15、CD11b 均阴性。淋系抗原 CD22、CD19、CD10、CD20、CD7、CD3、CD5、CD2 均阴性。P - gp 蛋白阴性。

2. AML 患者骨髓 AML 干细胞的数量和免疫表型: 86 例 AML 患者 CD34⁺CD38⁻细胞 (LSCs) 数量从 0.35% ~ 4.32% , 中位数 0.98% 。 86 例 AML - LSCs 的免疫表型: CD123⁺ 86 例 (100%) 、CD96⁺ 67 例

(77.91%) 、CD44⁺ 100 例 (100%) 、CD13⁺ 23 例 (26.74%) 、CD33⁺ 31 例 (36.05%) 、P - gp⁺ 58 例 (67.44%) ; CD117、HLA - DR 和 CD71 均阴性。部分蛋白表达见图 1A ~ C 与正常 HSCs 比较: CD123、CD96、CD33、CD13、P - gp 的表达量显著增高 (*P* 均 < 0.01) ; CD44 表达无明显差异 (*P* 均 > 0.05) 。髓系较分化抗原 CD64、CD14、CD15、CD11b 均不表达。淋系抗原 CD22、CD19、CD10、CD20、CD7、CD3、CD5、CD2 均阴性。AML - LSCs 与 HSCs 比较, 免疫表型差异主要为 CD123⁺、CD96⁺、CD117⁻、CD33⁺、CD13⁺ (表 1) 。

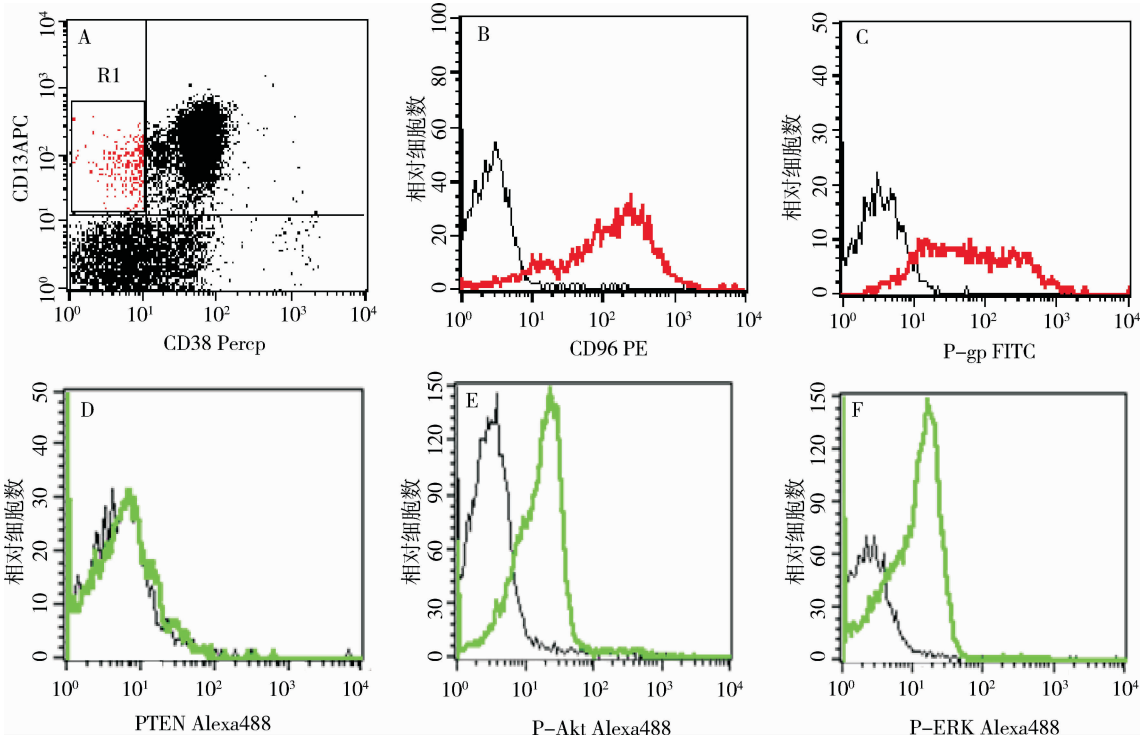


图 1 AML - LSCs 免疫表型和 PTEN、p - Akt 及 p - ERK 分析

A. R1 = CD34⁺CD38⁻细胞; B. CD34⁺CD38⁻CD96⁺细胞 (红色峰) ; C. CD34⁺CD38⁻P - gp⁺细胞 (红色峰) ;
D. PTEN 阴性; E. p - Akt 阳性占 56.31% ; F. p - ERK 阳性占 59.04% 。 D ~ F 为 AML - LSCs PTEN、
p - Akt 和 p - ERK 检测结果, 黑色峰为同型对照, 绿色峰为表达峰

表 1 正常造血干细胞和 AML 干细胞部分免疫表型和 P - gp 表达比较 [M (最小值 ~ 最大值) , %]

组别	CD123	CD96	CD44	CD117	CD13	CD33	P - gp
HSCs	1.19	4.95	90.13	34.40	2.34	2.55	2.39
(n = 18)	(0.25 ~ 2.31)	(1.40 ~ 9.10)	(80.63 ~ 96.14)	(20.31 ~ 65.14)	(0.22 ~ 9.54)	(0.22 ~ 14.22)	(0.65 ~ 4.64)
AML - LSCs	86.32	45.22	89.26	1.54	5.21	6.25	11.84
(n = 86)	(65.00 ~ 98.23)	(2.14 ~ 87.21)	(78.27 ~ 99.32)	(0 ~ 4.78)	(0.32 ~ 79.11)	(0.21 ~ 91.32)	(0.12 ~ 96.11)
<i>U</i>	6.40	5.68	0.62	6.64	3.35	2.21	3.64
<i>P</i>	< 0.01	< 0.01	> 0.05	< 0.01	< 0.01	< 0.05	< 0.01

3. PTEN、p - Akt 和 p - ERK 在正常造血干细胞上的表达: 正常 HSCs PTEN 100% 阳性, p - Akt 和 p

- ERK 均阴性。表达百分率和 MEI 值见表 2。Raji 细胞 PTEN 阳性率 63.25% 阳性。Jurkat 细胞 p - Akt

阳性率 78.52% 和 p-ERK 阳性率 86.21%。

4. PTEN、p-Akt 和 p-ERK 在 AML 干细胞上的表达:86 例 AML 患者的 AML-LSCs PTEN 阳性 22 例占 25.58%,与 HSCs 组比较 PTEN 的阳性率减低 ($\chi^2 = 30.88, P < 0.01$),表达百分率和 MFI 均减弱 (P

均 < 0.01)。p-Akt 阳性 55 例占 63.95%,p-ERK 阳性 61 例占 70.93%,与 HSCs 组比较 p-Akt 和 p-ERK 的阳性率增高 ($\chi^2 = 24.43, 30.87, P$ 均 < 0.01),见图 1D~F 表达百分率和 MFI 均增强 (P 均 < 0.01) (表 2)。

表 2 正常造血干细胞和 AML 干细胞 PTEN、p-Akt 及 p-ERK 的表达比较 [M (最小值 ~ 最大值)]

组别	PTEN		p-Akt		p-ERK	
	%	MFI	%	MFI	%	MFI
HSCs	42.2	25	2.52	7	1.34	7
(n = 18)	(18.24 ~ 72.14)	(13 ~ 35)	(0.45 ~ 4.16)	(4 ~ 9)	(0.58 ~ 3.47)	(5 ~ 9)
AML-LSCs	2.51	7	45.21	23	36.47	26
(n = 86)	(0.25 ~ 14.32)	(5 ~ 17)	(0.36 ~ 96.34)	(7 ~ 54)	(0.25 ~ 98.54)	(7 ~ 42)
U	6.64	6.54	3.73	5.30	4.71	5.29
P	< 0.01	< 0.01	< 0.01	< 0.01	< 0.01	< 0.01

5. AML 干细胞的数量与预后的关系:86 例 AML 患者中,除外 7 例因放弃治疗或转外院治疗失访,共计 79 例入组进行为期 3 ~ 35 个月随访。根据 AML-LSCs 的数量将 79 例 AML 患者分为两组:高 LSCs 组,AML-LSCs $\geq 0.98\%$ 的 AML 患者 32 例,低 LSCs 组,AML-LSCs $< 0.98\%$ 的 AML 患者 47 例。32 例 AML 患者复发 21 例占 65.63%,47 例 AML 患者复发 18 例占 38.30%,两者比较差异有统计学意义 ($\chi^2 = 5.69, P < 0.05$)。DFS 分析显示,高 LSCs 的 AML 患者无病生存时间中位数 14 个月,短于低 LSCs 组 AML 患者的无病生存时间中位数 28 个月,差异有统计学意义 (Log-rank 检验, $P < 0.01$) (图 2)。

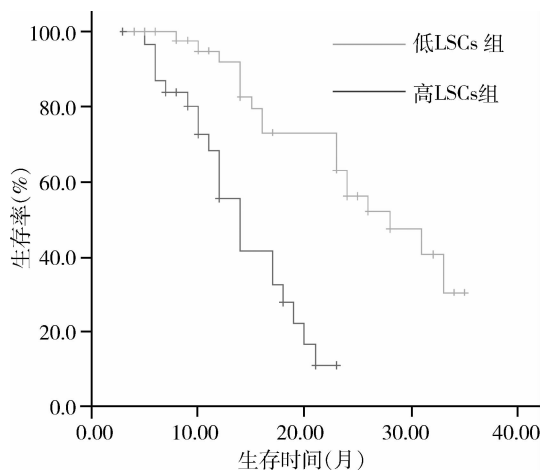


图 2 AML 患者生存分析

讨 论

研究结果表明,初诊 AML 患者骨髓 LSCs 数量很少,从 0.35% ~ 4.32%,中位数 0.98%,与既往文献报道的中位数 0.25% ~ 1.00% 类似^[6]。Rhenen

等^[7]发现,AML 患者 LSCs 的数量与预后有关,高 LSCs 的 AML 患者与体内残留病密切相关,易逃避化疗药物的作用,预后差。本组结果也表明高 LSCs 的 AML 患者复发率高于低 LSCs 的患者,无病生存分析显示,高 LSCs 患者的中位无病生存时间短于低 LSCs 患者。进一步证实,初诊时 AML 患者 AML-LSCs 数量与预后有关。

Jordan 等^[2]报道 CD123 在 AML 患者 CD34⁺ CD38⁻ 细胞上高表达,Hosen 等^[8]发现 60% 的 AML 患者的 LSCs 表达 CD96,表达水平比正常骨髓 HSCs 高 202 ~ 570 倍。我们的结果也显示 86 例 AML 患者 CD34⁺ CD38⁻ 亚群均强表达 CD123,CD96 的阳性率占 77.91%,显著高于其在正常 HSCs 表达量,与上述文献报道一致。提示 CD123、CD96 均是 LSCs 和 HSCs 鉴别的重要分化抗原,可能是潜在的单克隆抗体治疗的靶点^[2,8]。CD33、CD13 仅在近 1/3 的 AML 患者 LSCs 上表达,亦为临床上应用 CD33 单抗清除 LSCs 提供依据^[9]。CD44 在 AML-LSCs 和 HSCs 均高表达,尤其在 AML-LSCs 中普遍表达具有重要意义。体外研究证实^[10,11],CD44 单抗免疫治疗 AML 展现了潜在的应用前景。本研究组还发现 P-gp 耐药蛋白在 AML-LSCs 上高表达,可能与 AML-LSCs 易逃避化疗药物杀伤有关^[12]。

有文献报道^[2,4,13],AML 患者 LSCs 的增殖涉及 Raf/MEK/ERK, PI₃K/PTEN/Akt 和 Jak/STAT 等信号通路过度活化。有研究显示 PTEN 在造血干细胞系列选择和白血病发生中起关键的作用,PTEN 表达缺失易导致 LSCs 的发生。本研究结果显示,正常 HSCs PTEN 蛋白高表达,p-Akt 和 p-ERK 低表达。

LSCs PTEN 蛋白阳性率仅 25.58%,与正常 HSCs 比较表达量明显减低,但是 p-Akt 和 p-ERK 水平却显著增高。提示 LSCs $PI_3K/PTEN/Akt$ 和 MEK/ERK 信号通路被激活。生理条件下,PTEN 分子特异地从肌醇环上 3 位脱磷酸,使 $PI(3,4,5)P_3$ 转化成 $PI(4,5)P_2$,抑制 PI_3K/Akt 信号转导途径,从而调控 HSCs 的生长、分化和凋亡。LSCs 由于 PTEN 蛋白过度减少, $PI(3,4,5)P_3$ 不能转化成 $PI(4,5)P_2$ 而不断积累, PI_3K 途经信号增强活化 Akt。同时高表达的 CD123 与 IL-3 结合,一方面通过信号通路 MEK/ERK 使 PU.1 磷酸化;另一方面通过 PI_3K/Akt 信号通路激活 CREB;两者共同作用引起 mcl-1 基因转录,而 mcl-1 是一种抗凋亡的基因,最终促使 LSCs 分化、凋亡受阻而持续克隆性增殖和自我更新。

综上所述,LSCs 可能是白血病细胞不断生长的根源,是白血病发生、发展的起始细胞。少量的 LSCs 具有无限增殖和自我更新能力,能逃逸化学药物治疗作用,从而导致白血病复发。如果通过针对 LSCs 高表达的分化抗原进行单克隆抗体靶向治疗,以及针对 $PI_3K/PTEN/Akt$ 和 MEK/ERK 信号通路开发小分子靶向抑制药物,可望彻底清除 LSCs,从而达到临床长期稳定缓解,为急性白血病治疗提供新的策略。

参考文献

- 1 Kondo M, Wagers AJ, Manz MG, *et al.* Biology of hematopoietic stem cells and progenitors: implications for clinical application[J]. *Annu Rev Immunol*, 2003, 21: 759-806
- 2 Jordan CT, Upchurch D, Szilvassy SJ, *et al.* The interleukin-3 receptor alpha chain is a unique marker for human acute myelogenous leukemia stem cells[J]. *Leukemia*, 2000, 14(10):1777-1784
- 3 Van Rhenen A, Moshaver B, Kelder A, *et al.* Aberrant marker expression patterns on the $CD34^+CD38^-$ stem cell compartment in acute myeloid leukemia allows to distinguish the malignant from the nor-

- mal stem cell compartment both at diagnosis and in remission[J]. *Leukemia*, 2007, 21(8):1700-1707
- 4 Bardet V, Tamburini J, Ifrah N, *et al.* Single cell analysis of phosphoinositide 3-kinase/Akt and ERK activation in acute myeloid leukemia by flow cytometry[J]. *Haematologica*, 2006, 91(6):757-764
- 5 Yang J, Liu J, Zheng J, *et al.* A reappraisal by quantitative flow cytometry analysis of PTEN expression in acute leukemia[J]. *Leukemia*, 2007, 21(9):2072-2074
- 6 Jordan CT. Unique molecular and cellular features of acute myelogenous leukemia stem cells[J]. *Leukemia*, 2002, 16(4):559-562
- 7 Rhenen A, Feller N, Kelder A, *et al.* High stem cell frequency in acute myeloid leukemia at diagnosis predicts high minimal residual disease and poor survival[J]. *Clin Cancer Res*, 2005, 11(18):6520-6527
- 8 Hosen N, Park CY, Tatsumi N, *et al.* CD96 is a leukemic stem cell specific marker in human acute myeloid leukemia[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104(26):11008-11013
- 9 Larson RA, Sievers EL, Stadtmauer EA, *et al.* Final report of the efficacy and safety of gemtuzumab ozogamicin (Mylotarg) in patients with CD33 positive acute myeloid leukemia in first recurrence[J]. *Cancer*, 2005, 104(7):1442-1452
- 10 Charrad RS, Gadhoum Z, Qi J, *et al.* Effects of anti-CD44 monoclonal antibodies on differentiation and apoptosis of human myeloid leukemia cell line[J]. *Blood*, 2002, 99(1):290-299
- 11 Jin L, Hope KJ, Zhai Q, *et al.* Targeting of CD44 eradicates human acute myeloid leukemic stem cells[J]. *Nat Med*, 2006, 12(10):1167-1174
- 12 Maria-Carolina T, Pint O, Luciana C. *et al.* Determination of P-glycoprotein, MDR-related protein 1, breast cancer resistance protein, and lung-resistance protein expression in leukemic stem cells of acute myeloid leukemia[J]. *Cytometry Part B: Clinical Cytometry*, 2008, 74B(3):163-168
- 13 Steelman LS, Abrams SL, Whelan J, *et al.* Contributions of the Raf/MEK/ERK, $PI3K/PTEN/Akt/mTOR$ and Jak/STAT pathways to leukemia[J]. *Leukemia*, 2008, 22(4):686-707

(收稿:2011-03-24)

(修回:2011-09-09)

(上接第 74 页)

传易感性和检测方法不同有关。本研究确定了我国河南省漯河地区食管癌组织中有 HPV 存在,其中 HPV16 的感染占很大比例,并且 HPV 感染可能是食管癌发生的重要病因。这为下一步阐明食管癌多阶段演进的分子机制,建立高危人群检测和早期诊断生物指标和手段奠定了工作基础。

参考文献

- 1 Karlsen F, Kalantari M, Jenkins A, *et al.* Use of multiple PCR sets for optimal detection of human papillomavirus[J]. *J Clin Microbiol*, 1996, 34(2):2095-2100
- 2 Sotlar K, Diemer D, Dethleffs A, *et al.* Detection and typing of human

papillomavirus by E6 nested multiplex PCR[J]. *J Clin Microbiol*, 2004, 42(5):3176-3184

- 3 Gao GF, Roth MJ, Wei WQ, *et al.* No association between HPV infection and the neoplastic progression of esophageal squamous cell carcinoma: Result from a cross-sectional study in a high-risk region of China[J]. *Int J Cancer*, 2006, 119(3):1354-1359
- 4 Zur HH. Cervical carcinoma and human papillomavirus on the road to preventing a major human cancer[J]. *J Natl Cancer Inst*, 2001, 93(6):252-253
- 5 李淑英,李颖,王立东,等.应用聚合酶链反应检测食管癌组织中乳头状瘤病毒[J]. *中华实验和临床病毒学杂志*, 2008, 22(3):251-253

(收稿:2010-12-30)

(修回:2011-02-18)