

• 临床研究 •

急性早幼粒细胞白血病维甲酸耐药性的双向电泳分析^{*}

刘希成 梁 恒 田 真 邢建宇

(西安交通大学 生物医学信息工程教育部重点实验室 生命科学与技术学院 西安 710049)

摘要 目的: 研究急性早幼粒细胞白血病(APL)对全反式维甲酸(ATRA)治疗敏感和耐药患者的外周血淋巴细胞在蛋白质组水平上的差异。方法: 采用双向凝胶电泳(2-DE)对敏感和耐药患者的外周血淋巴细胞进行蛋白质组差异分析。结果: ATRA敏感和耐药患者外周血淋巴细胞的2-DE平均蛋白质点分别为(746±57)和(617±41),敏感与耐药患者的2-DE相比,有16个蛋白点表达明显上调,22个明显下调。另有4个蛋白点(Mr/pI: 24.6kD/8.05, 32.3kD/5.17, 22.3kD/6.51, 25.1kD/7.09)在敏感患者中特异表达,5个蛋白点(Mr/pI: 21.9kD/5.45, 23.4kD/6.27, 22.9kD/6.65, 23.9kD/7.39, 24.7kD/7.65)在耐药患者中特异表达。结论: 结果提示这些差异表达的蛋白质可能与APL对ATRA耐药的机制有关,该研究有助于揭示APL对ATRA耐药机理和发现新的临床分子标志物。

关键词: 双向电泳; 蛋白质组; 急性早幼粒细胞白血病; 外周血淋巴细胞

中图分类号: R733.71 **文献标识码:** A

Two-dimensional electrophoresis analysis of mechanism of APL resistant to ATRA

LIUXi-cheng, LIANG Heng, TIEN Zhen, XING Jian-yu

(The Key Laboratory of Biomedical Information Engineering of Education Ministry, School of Life Science and Technology, Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710049, China)

ABSTRACT Objective: To explore the differential proteome expressions of lymphocytes in the peripheral blood of the patients with acute promyelocytic leukemia (APL) sensitive to all-trans retinoic acid (ATRA) and the patients with APL resistant to ATRA. **Methods:** High resolution two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis (2-DE) was used to analyse lymphocytes in the peripheral blood of the patients with APL sensitive to ATRA and the patients with APL resistant to ATRA. **Results:** The average protein spots of 2-DE of lymphocytes in the peripheral blood of the patients with APL sensitive to ATRA and the patients with APL resistant to ATRA were 746±57 and 617±41, respectively. Compared with the patients resistant to ATRA, the expressions of 16 protein spots increased obviously, in the peripheral blood lymphocytes of the patients with APL sensitive to ATRA, 22, decreased, 4 (Mr/pI: 24.6kD/8.05, 32.3kD/5.17, 22.3kD/6.51, 25.1kD/7.09), specifically expressed. 5 protein spots (Mr/pI: 21.9kD/5.45, 23.4kD/6.27, 22.9kD/6.65, 23.9kD/7.39, 24.7kD/7.65) were specifically expressed in the peripheral blood lymphocytes of the patients with APL resistant to ATRA. **Conclusion:** From the above-mentioned results, it is concluded that these proteins may be involved in the mechanism of ATRA resistance, the differential expression analysis of proteomes may be useful to further study of the ATRA-resistant mechanisms and the molecular markers of APL.

Key words: Two-dimensional electrophoresis; Proteome; Acute promyelocytic leukemia; Peripheral blood lymphocytes

急性早幼粒细胞白血病 (Acute promyelocytic leukemia, APL) 是急性髓细胞白血病 (Acute myeloid leukaemia, AML) 的 M3 亚型, 占有 AML 的 10~15%^[1]。95% 以上的 APL 患者具有特征性的 t(15;17) 染色体易位, 即第 15 号染色体长臂 22 的维甲酸受体 α (RARα) 基因及第 17 号染色体长臂 21 的早幼粒细胞白血病 (PML) 基因相互移位, 形成融合基因及其编码的早幼粒细胞白血病-维甲酸受体 α 融合蛋白 (PML-RARα), 少数 APL 患者产生 t(11;17) 染色体易位。APL 也被命名为 AML-M3 或 t(15;17) 染色体易位^[2]。APL 占 AML 病人总数的 10~15%, 我国某些地区高达 32%, 在西班牙的一些地区高达

46%^[3]。1987 年, 我国科学家首先引入全反式维甲酸 (All-trans retinoic acid, ATRA) 作为诱导分化剂治疗 APL 取得喜人进展^[4], 受到国际科学界的高度肯定, 被《Science》杂志称为是让每个人感到震惊的成果^[5]。然而, 快速发生的 ATRA 耐药性严重影响 ATRA 对 APL 的治疗效果。除了 t(11;17) APL 病人对 ATRA 耐药外, 许多 t(15;17) APL 病人在接受 ATRA 治疗后复发也出现二次耐药性^[6]。这种耐药性可部分地由 ATRA 的血药浓度迅速下降或者细胞内 ATRA 结合蛋白的表达增加来解释^[7]。从 ATRA 治疗复发病人分离白细胞的胚细胞在体外实验中, 发现对 ATRA 介导的分化产生耐药, 表明 ATRA 耐药涉

* 基金项目: 国家自然科学基金资助 (No. 90209016)

作者简介: 刘希成, (1975-), 男, 在读博士, 研究方向: 蛋白质组学

通讯作者: 梁恒, 教授, 博士生导师, Tel: 029-82663992, E-mail: lheng@mail.xjtu.edu.cn

(收稿日期: 2006-05-10 接受日期: 2006-05-30)

及胞内机制^[8]。RAR α 的某种突变,在APL细胞对ATRA产生耐药机制中可能起重要作用,但目前对ATRA诱导APL细胞产生RAR α 突变的机制尚不清楚,克服耐药的治疗策略仍在研究之中^[9]。已有的研究提示,APL细胞对ATRA产生耐药机制不仅是在基因水平的改变,也涉及到基因改变所引起的蛋白质组层次的、特别是蛋白质信号分子的变化。

本文利用2-DE技术,通过比较ATRA敏感以及治疗后产生ATRA耐药的APL病人的外周血淋巴细胞在蛋白质表达上的差异,发现了与ATRA敏感和耐药有关的在表达量和特异表达的一组蛋白质,为从蛋白质组分子水平探索APL对ATRA耐药的机制,发现新的临床分子标志物提供理论依据。

1 材料和设备

1.1 材料和试剂

外周血淋巴细胞分别来自临床维甲酸敏感病人12例、维甲酸治疗后产生耐药性的病人8例和健康志愿者5例。3-[(3-胆酰胺丙基)-二乙胺]-丙磺酸(CHAPS),三羟甲基氨基甲烷(Tris-Base),尿素(Urea),硫脲(Thiourea),二硫苏糖醇(DTT),丙烯酰胺(Acrylamide),N,N'-甲叉双丙烯酰胺(N,N'-Methylene bisacrylamide),过硫酸铵(APS),四甲基乙二胺(TEMED),十二烷基磺酸钠(SDS)均购自Sigma公司;低分子量标准蛋白质(96-14.4KD)购自华美生物工程公司;载体两性电解质(CA, pH=3.5~9.5),矿物油(Silicon oil),IPG干胶条(PH3~10, 17cm)均购自Bio-Rad公司;其它试剂均为国产分析纯;所有溶液均用双蒸水配制。

1.2 设备

PROTEAN IEF cell等电聚焦仪、PROTEAN II Xi 2-D cell垂直电泳系统和PDQuest 2D分析软件(Bio-Rad公司);TGL-16G-A高速冷冻离心机(上海安亭科学仪器厂)。

2 实验方法

2.1 外周血淋巴细胞分离

分别无菌抽取ATRA敏感患者、ATRA耐药患者及健康志愿者外周血10mL,移入加有抗凝剂(肝素钠)的试管中,用磷酸盐缓冲液(PBS)稀释至20mL,将混合液小心分别移入已装有5mL淋巴细胞分离液的3支离心管中(不要扰乱界面),2000r/min离心20min。小心吸取中间白色的淋巴细胞层,分别移入离心管中,为了保证样品的均一性,我们分别将3类样品的淋巴细胞混合,以便消除个体差异,然后用PBS液洗涤3次,加入PBS调节细胞浓度至5.0107/mL备用。

2.2 蛋白样品制备

细胞用PBS洗涤3次后,离心收集到1.5mL Eppendorf管,吸干残留PBS;加入50 μ L裂解液(7mol/L Urea, 2mol/L Thiourea, 4%(W/V) CHAPS, 40mmol/L Tris-Base, 40mM DTT),室温振荡1h, 4 $^{\circ}$ C、24000r/min离心1h;吸取上清,Bradford法测蛋白浓度。

2.3 双向电泳

将26 μ L样品与水化液(8mol/L 尿素, 2% CHAPS (W/V)、0.5% IPG缓冲液(pH3~10), 18mmol/L DTT和痕量溴酚蓝)混合至总积为300 μ L,加入持胶槽中,IPG干胶条胶面朝下放入持胶

槽中,并覆盖一层矿物油以防样品蒸发,盖好后20 $^{\circ}$ C被动泡涨12h。泡涨后将持胶槽放入PROTEAN IEF cell等电聚焦仪电极板上,等电聚焦按设定的程序(200V, 1h; 500V, 2h; 1000V, 1h; 8000V, 5h)自动进行。等电聚焦后IPG胶条在平衡缓冲液(50mmol/L Tris-HCl, pH8.8, 6mol/L 尿素, 30%甘油(w/v), 2% SDS(w/v), 1% DTT)平衡15min,再用2.5%碘乙酰胺替换1% DTT在同样平衡液中平衡15min。胶条移置1mm厚、浓度12.5%的SDS-PAGE均匀胶上端,0.5%琼脂糖(含有痕量溴酚蓝)封胶,在胶条右端外侧加入低分子量标准蛋白质。SDS-PAGE在PROTEAN II Xi 2-D cell垂直电泳系统中进行,循环水冷却,20mA/胶,电泳30min后换成30mA/胶电泳,直到溴酚蓝到达胶的底边缘即可结束电泳。

2.4 银染

参考文献^[10]并加以改进。凝胶置于固定液(40%甲醇、10%冰醋酸)中过夜;再将胶片置于敏化液(30%乙醇, 6.8%醋酸钠, 0.5%戊二醛(25%w/v), 0.2%硫代硫酸钠)中敏化30min;水洗3次,每次10min;再用银溶液(0.25%硝酸银, 0.04%甲醛)染色30min;水洗2次,每次1min;置于显色液(2.5%碳酸钠, 0.02%甲醛)中显影至斑点清晰出现;将凝胶放在1.46% EDTA-Na $_2$ H $_2$ O溶液中终止反应10min;水洗三次,每次5min。

2.5 图像采集与分析

染色后扫描获得图像,用PDQuest 2D分析软件对扫描图像进行分析,其过程包括斑点检测、量化、背景消减和匹配,蛋白点自动检测后进行编辑,蛋白点的等电点和分子量采用二维校正法确定。

3 结果

3.1 三种细胞总蛋白的2-DE谱图

在相同条件下对三种样品进行3次双向电泳,对ATRA敏感和耐药的APL患者以及健康者的外周血淋巴细胞的2-DE见图1。根据Cartesian坐标系,从左到右等电点PI从3.0增加到10.0,从下往上分子量从20.1KD增加到94.0KD。外周血淋巴细胞样品经2-DE分离、银染、图像分析后检测到敏感、耐药和健康者外周血淋巴细胞的平均蛋白质点分别为74657、61741和125776个,分别对应于图1的(A)、(B)和(C)。在取血、样品处理过程完全相同的条件下,健康者2-DE图谱的蛋白质点数明显高于APL患者图谱的蛋白质点数($P > 0.01$),提示ATRA敏感和耐药的APL患者的淋巴细胞大部分是未分化成熟的幼稚细胞,蛋白质表达在数量上显著减少。从图1可见,在该实验条件下,左右两侧斑点较少,中间(pI在7.0附近)斑点数目相对集中,示意中性蛋白较多;而酸性蛋白又明显多于碱性蛋白;蛋白点在Mr25~70kD范围内分布最多。

3.2 2-DE蛋白质点的匹配率

以3个ATRA敏感外周血淋巴细胞2-DE图谱的其中一个为参考图谱,其余图谱中蛋白质点与参考图谱的平均匹配点数为60583个($n=3$);ATRA耐受患者淋巴细胞2-DE图谱的平均匹配点数为51871个($n=3$)。在高分子量和低分子质量区及pH梯度的两端蛋白质点的变化稍大,在中间区域蛋白质点的重现性很好。

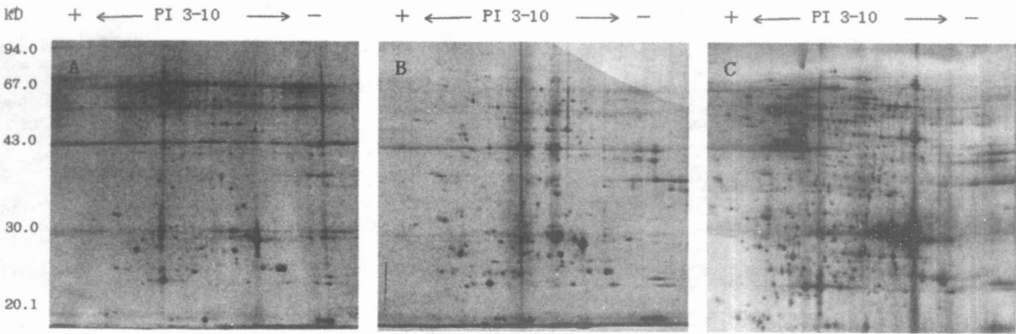


图1 外周血淋巴细胞的2- DE图谱

A: ATRA 敏感患者; B: ATRA 耐药患者; C: 健康志愿者

Fig. 1 Two- dimensional electrophoresis gel of human peripheral blood lymphocytes

A: ATRA- sensitive APLs; B: ATRA- resistant APLs; C: Healthy volunteers

3.3 ATRA 敏感与耐药患者的 2- DE 差异分析

图1经PDQuest 2D软件分析,共有428个蛋白质点匹配, ATRA 敏感患者有318个点未被匹配,耐药患者有191个点未被匹配;图2是用PDquest 2D软件搜寻和数据分析后,所标注的 ATRA 敏感和耐药患者外周血淋巴细胞的2- DE图谱5倍差异以上的蛋白点。敏感与耐药患者相比,有16个蛋白点表达明显上调(5倍差异以上),22个蛋白点表达明显下调(5倍

差异以上)。其中10倍量差异以上的蛋白点共有12个,敏感是耐药蛋白点的10倍量以上的有6个,敏感是耐药蛋白点的1/10倍量以下的也有6个,这12个蛋白点的等电点和分子量见表1。另外,有4个蛋白点在 ATRA 敏感细胞中特异表达,有5个蛋白点在耐药细胞中特异表达,特异表达的蛋白点的局部放大对比图谱如图3,这9个特异表达的蛋白质的等电点和分子量见表2。

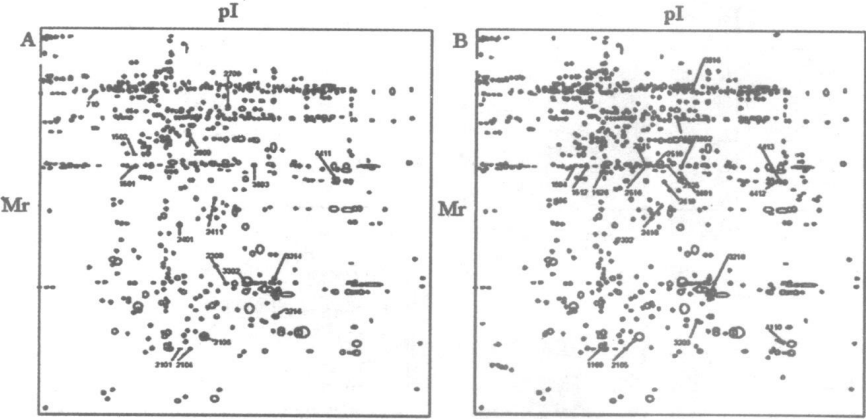


图2 ATRA 敏感(A)和 ATRA 耐药(B)患者外周血细胞 2- DE图的数字合成图谱

图中箭头所指为 5 倍以上差异表达的蛋白点

Fig. 2 Two digital composite standard atlas of ATRA- sensitive and ATRA- resistant APLs created by PDquest 2D software is shown in the panel (A) and (B)
The labeled spots indicate the protein spots with the significant abundance difference (over 10 times).

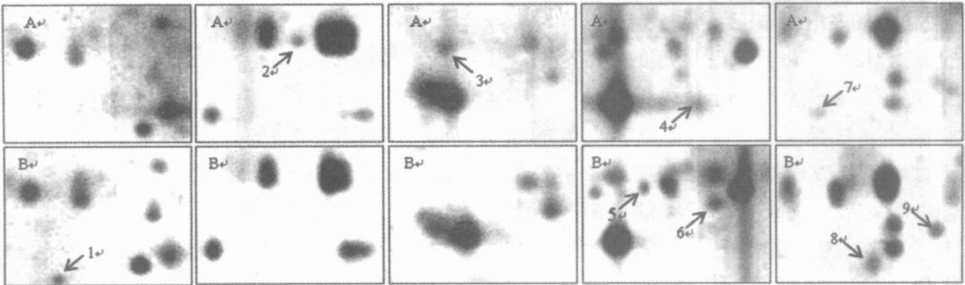


图3 图1中部分特异表达的蛋白点放大图谱

图中箭头所指为特异表达的蛋白点

Fig. 3 The panels represents specifically expressed protein spots in the enlarged regions from Fig. 1

The arrows indicate the position of the specifically expressed protein spots

表 1 图 2 中 10 倍以上差异表达的蛋白点的等电点、分子量、相对含量及差异倍数

Spot No	Isoelectric point	Molecular mass(kDa)	Quantity		Multiple(A> B)
			Sensitive(A)	Resistant(B)	
3216	7. 8	25. 1	18458	355	51. 9
3503	7. 5	43. 0	24058	1252	19. 2
2401	6. 32	34. 7	24930	2069	12. 0
710	4. 98	62. 3	13628	1160	11. 7
2106	6. 72	23. 3	100589	8988	11. 2
2101	6. 33	22. 3	4123	412	10. 0
2516	6. 8	43. 3	4937	50425	0. 098
3816	7. 6	64. 8	2164	26015	0. 083
4110	9. 0	22. 9	715	10652	0. 067
3218	7. 9	27. 5	4473	84782	0. 053
2105	6. 65	22. 9	849	18465	0. 046
3502	7. 4	42. 8	389	14108	0. 028
1526	6. 17	43. 0	408	50626	0. 008

* Spot No. is created by PDQuest 2- DE software.

表 2 图 3 中特异表达蛋白点的等电点和分子量

Table 2 Experimental isoelectric points and approximate molecular mass of the special protein spots shown in Fig. 3

Variety Reference spot No.	2- DE Gel		Isoelectric point	Molecular mass (kDa)
	Sensitive (A)	Resistant (B)		
1	No	Yes	5. 45	21. 9
2	Yes	No	8. 05	24. 6
3	Yes	No	5. 17	32. 3
4	Yes	No	6. 51	22. 3
5	No	Yes	6. 27	23. 4
6	No	Yes	6. 65	22. 9
7	Yes	No	7. 09	25. 1
8	No	Yes	7. 36	23. 9
9	No	Yes	7. 65	24. 7

* Panels (A), (B) show the maps of ATRA- sensitive APLs, ATRA- resistant APLs, respectively.

4 讨论

2- DE 是当前分离复杂蛋白混合物最有效的方法之一，用于多种器官和组织的高通量地分析和鉴定蛋白质组成，特别是用来从整体水平上分析细胞全蛋白表达的差异变化，已成为蛋白质组学研究的一个重要手段^[11]。

在分析样品时细心地操作(如样品制备、胶条泡涨、加样、染色和使用高品质试剂等环节)，这对保持良好的重现性是必要的。样品制备是 2- DE 中最为关键的一步，这一步处理的好坏将直接影响 2- DE 结果。由于细胞内的蛋白质是极其不稳定的，随着细胞生物功能的变化而快速地改变，所以样品来源和样品处理过程的标准化可有助于保持良好的重现性^[12]。此外，银染的灵敏度很高，可染出胶上低于 1ng 蛋白质点。但是银着色与蛋白量所成的非线性关系，影响了蛋白质点的精确定量；此外，银离子对半胱氨酸残基的修饰和在染色中使用的戊二醛和甲醛对蛋白质氨基的烷基化使后续的质谱分析很难得到理想的结果^[13]。所以，为了进一步的分析鉴定蛋白点，需对银染方法进行优化，使其兼容后续的质谱分析；或者用银染法进行分析处理，再用考染法来进行样品微量制备。我们使用了商品化的固相 pH 梯度预制胶条和优化的操作程序^[14]，保持了良好的重现性，甚至在不同批次的样品和不同时间进行的实验中都保持了良好的重现性。此外，使用软件对

不同批次的 2- DE 胶进行处理，获得标准数字化图像，这是消除胶与胶之间系统差异的重要手段之一。2- DE 标准数字化图像可应用多种统计方法分析数据，其缺点是可能使一些微弱的蛋白变化得不到显示^[15]。图 2 是用 PDQuest2D 分析软件处理产生的数字化图像，从而较容易地从复杂的蛋白点中发现差异蛋白点。

使用 ATRA 诱导分化使 APL 完全缓解后，仅用 ATRA 维持治疗的多数患者易在短期内复发，再用 ATRA 治疗，疗效不佳，这种快速发生的耐药性成为 ATRA 治疗 APL 中急待解决的关键问题。PML- RAR α 是 APL 的致病基因，由此翻译产生的蛋白不仅与白血病的发生有关，也与 ARTA 治疗的敏感性有关。有研究认为，在 ARTA 耐药细胞中 PML- RAR α 融合基因不能表达结构完整的 PML- RAR α 蛋白，从而影响 ATRA 与 PML- RAR α 蛋白的结合^[16]；另有报道认为，APL 细胞中 PML- RAR α 的转录表达并未减少，对 ATRA 耐受的 APL 细胞可能与其 PML- RAR α 融合蛋白的快速降解有关，这一蛋白快速降解应是蛋白翻译后的变化^[17]。在本研究中，发现敏感和耐受细胞在蛋白质表达水平上发生了很大变化，这些显著变化的蛋白质应该与外周血淋巴细胞中 ATRA 耐药产生的过程有关。然而，要具体地阐明这些差异和特意表达的蛋白质在 ATRA 耐药产生的过程中所发挥的分子生物学功能，譬如，这些蛋白质在信号传导通路中的作用，还应该采取免疫亲和分离和质谱等手

段^[18]在蛋白质组水平上深入探讨。

应用 2-DE 对 ATRA 敏感和耐药的 APL 患者外周血淋巴细胞全蛋白质进行差异分析,发现敏感患者外周血淋巴细胞(与耐药患者比较)中有 16 个蛋白点表达显著上调,22 个蛋白点表达水平明显下调,其中 10 倍以上差异的有 12 个点,如表 1 所示。在 ATRA 敏感淋巴细胞中还有 4 个蛋白点特异表达,有 5 个蛋白点在耐药细胞中特异表达(见表 2)。表 1 所列的 9 种特异表达的蛋白质,可为 ATRA 耐药早期临床诊断及建立更为快速方便的检测方法(如免疫分析、毛细管电泳或微流控蛋白芯片分析)提供分子标志物。本实验发现的差异表达的蛋白质的等电点大部分集中在 7 左右,分子量范围在 30-60kD 之间,而以往已经发现的与 ATRA 耐药产生有关的蛋白如 PML-RAR α 融合蛋白、胞质维甲酸结合蛋白 II 及 P 糖蛋白等^[19]分子量均都在 100kD 以上,提示这些差异蛋白点可能是一些与耐药产生相关的信号分子,这些蛋白点表达的变化影响了相关信号传导通路,从而使上述蛋白的表达发生变化,导致了耐药的产生。上述 2-DE 发现 ATRA 耐药的差异和特异蛋白,还需进一步地质谱分析鉴定和确认。深入研究这些筛选出的 ATRA 耐药相关的蛋白质是研究 ATRA 耐药机制、治疗 APL 的疗效评价和开发 APL 新药物的重要途径。

致谢:感谢西安交通大学第一附属医院张梅、贺鹏程及第二附属医院李和程医师提供病人样品。

参考文献

- [1] 陈赛娟,赵萌,陈竺.全反式维甲酸和三氧化二砷治疗急性早幼粒细胞白血病 APL 的进展[J].肿瘤,2001,21(6):415-418
- [2] Vardiman J W, Harris N L, Brunning R D. The world health organization (WHO) classification of the myeloid neoplasms [J]. Blood, 2002, 100(7):2292-2302
- [3] Simnìt P, Martin S T. Acute promyelocytic leukaemia: a review [J]. Expert. Opin. Pharmacother, 2003, 4(8):1379-1392
- [4] Huang M E, Ye Y C, Wang Z Y. Treatment of four APL patients with all-trans retinoic acid [J]. Chin. J. Intern. Med, 1987, 26:330-332
- [5] Mervis J. Ancient remedy performs new tricks [J]. Science, 1996, 273(5275):578
- [6] Richard J L, David A E, Ronald M E. Molecular genetics of acute promyelocytic leukemia [J]. Trends Genet, 1999, 15(5):179-184
- [7] Warrell R P. Retinoid resistance in acute promyelocytic leukemia: new mechanisms, strategies, and implications [J]. Blood, 1993, 79:299-304
- [8] David J T. Acute promyelocytic leukemia fusion proteins: up to new tricks [J]. Blood, 2003, 101(9):3343-3344
- [9] Jing Y K, Wang L, Xia L J, et al. Combined effect of all-trans retinoic acid and arsenic trioxide in acute promyelocytic leukemia cells in vitro and in vivo [J]. Blood, 2001, 97(1):264-269
- [10] Hewett P W. Identification of tumour-induced changes in endothelial cell surface protein expression: an in vitro model [J]. The International Journal of Biochemistry and Cell Biology, 2001, 33:325-335
- [11] Jenkins R E, Pennington S R. Arrays for protein expression profiling towards a viable alternative to two-dimensional gel electrophoresis? [J]. Proteomics, 2001, 1:13-29
- [12] Cohena A M, Coombs G H, Rumpel K, et al. Characterisation of global protein expression by two-dimensional electrophoresis and mass spectrometry: proteomics of Toxoplasma gondii [J]. International Journal for Parasitology, 2002, 32:39-51
- [13] Patton W F. A thousand points of light the application of fluorescence detection technologies to two-dimensional gel electrophoresis and proteomics [J]. Electrophoresis, 2000, 21:1123-1144
- [14] 梁恒,邢建宇,刘希成,等.小鼠肾脏组织的双向电泳[J].西安交通大学学报,2004,38(2):212-216
- [15] Vohradsky J. Adaptive classification of two-dimensional gel electrophoretic spot patterns by neural networks and cluster analysis [J]. Electrophoresis, 1997, 18:2749-2754
- [16] Demime S, Grignani F, Clerici M, et al. Occurrence of resistance to retinoic acid in the acute promyelocytic leukemia cell line NB4 is associated with altered expression of the pml/RAR α protein [J]. Blood, 1993, 82(5):1573-1577
- [17] Fanelli M, Nervi C, Pelicci P G, et al. Constitutive degradation of the PML-RAR α protein is present in retinoic acid (RA) 2resistant acute promyelocytic leukemia cells and involves the proteasome proteolytic pathway [J]. Blood, 1997(abstr, suppl 1), 90:70a
- [18] Yuen H, Albrecht G, Adrian D, et al. HEILBUTSystematic identification of protein complexes in Saccharomyces cerevisiae by mass spectrometry [J]. Nature, 2002, 415(10):180-183
- [19] Pitha I, Petty W J, Kitareewan S, et al. Retinoid target genes in acute promyelocytic leukemia [J]. Leukemia, 2003, 17, 1723-1730