

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2014.17.007

Ras 蛋白在地塞米松体外诱导大鼠胚胎垂体生长激素细胞分化过程中的作用 *

程 玉¹ 张 宇¹ 胡志强² 李国忠¹ 项 莹³ 胡恩喜¹
王 超⁴ 关 峰² 陶 宇¹ 郑宏山¹

(1 哈尔滨医科大学附属第一医院神经外科 黑龙江 哈尔滨 150001; 2 北京世纪坛医院神经外科 北京 100038; 3 哈尔滨医科大学附属第二医院内分泌与代谢科 黑龙江 哈尔滨 150086; 4 哈尔滨医科大学附属第四医院神经外科 黑龙江 哈尔滨 150001)

摘要 目的:探究 Ras 蛋白在地塞米松体外诱导大鼠胚胎垂体生长激素细胞分化过程中的作用。**方法:**本课题利用大鼠胚胎垂体细胞的无血清原代细胞培养技术,在地塞米松诱导生长激素细胞分化的过程中,加入蛋白 Ras 的抑制剂 Manumycin,利用免疫荧光、western-blot、放射免疫分析和 MTT 等技术对 Ras 蛋白在糖皮质激素体外诱导生长激素细胞分化中的作用进行研究。**结果:**地塞米松能够显著提高生长激素阳性细胞百分比和生长激素的含量($P<0.01$)。加入不同浓度的 Manumycin 后,地塞米松诱导的生长激素阳性细胞百分比显著降低($P<0.01$),生长激素的含量亦出现降低($P<0.05$)。**结论:**Ras 蛋白在地塞米松诱导垂体生长激素细胞分化过程中发挥重要作用。

关键词:地塞米松;垂体;生长激素细胞;分化;Ras 蛋白

中图分类号:Q95-3, Q593.2, R132.7 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2014)17-3228-04

The effect of Ras on Dexamethasone-induced Rat Embryonic Pituitary Somatotroph Cell Differentiation in vitro*

CHENG Yu¹, ZHANG Yu¹, HU Zhi-qiang², LI Guo-zhong¹, XIANG Ying³, HU En-xi¹, WANG Chao⁴, GUAN Feng²,
TAO Yu¹, ZHENG Hong-shan¹

(1 Department of Neurosurgery of First Affiliated Hospital, Harbin Medical University, Harbin, Heilongjiang, 150001, China;

2 Department of Neurosurgery of Beijing, Shijitan, Hospital, Beijing, 100038, China;

3 Department of Endocrinology of Second Affiliated Hospital, Harbin Medical University, Harbin, Heilongjiang, 150086, China;

Department of Neurosurgery of Forth Affiliated Hospital, Harbin Medical University, Harbin, Heilongjiang, 150001, China)

ABSTRACT Objective: The function of Ras is to be explored in dexamethasone-induced differentiation of rat embryonic pituitary somatotroph cells *in vitro*. **Methods:** The pituitary was harvested for fetal pituitary cell suspension. In the experiment Ras inhibitor Manumycin of different concentrations were added to the suspension for pretreatment and cells were cultured with a medium containing Dex. And also immunofluorescence, Western-blot, radioimmunoassay and MTT Technology were used in this experiment. **Results:** Dex treatment increased the percentage of GH-positive cells and GH content ($P<0.01$). After pretreatment with Manumycin, the percentage of Dex-induced GH-positive cells decreased significantly ($P<0.01$), and the GH content also reduced ($P<0.05$). **Conclusion:** Ras protein plays an important role in the dexamethasone-induced growth hormone cell differentiation.

Key words: Dexamthasone; Pituitary; GH cell; Differentiation; Ras protein

Chinese Library Classification(CLC): Q95-3, Q593.2, R132.7 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2014)17-3228-04

前言

垂体的解剖可分为腺垂体和神经垂体。腺垂体内含 6 中具有分泌活性的细胞。其中,生长激素细胞的分化受多种细胞内和细胞外因子的调控。在胚胎期^[1]和胎儿期^[2],机体下丘脑释放促生长激素释放激素,通过下丘脑-垂体-肾上腺轴和下丘脑-垂体-甲状腺轴诱导生长激素分化^[3],能够影响上述两个靶腺轴功能的因子有许多,例如糖皮质激素^[4]、甲状腺激素^[5]、维甲酸^[6]、

一氧化氮^[9]等均可调控生长激素细胞的分化。

糖皮质激素在胚胎生长激素细胞的分化过程中发挥着非常重要的作用。我们的前期实验已经证实地塞米松体外诱导生长激素细胞分化的最佳有效浓度为 50 nmol/L,最佳时间为 48 h^[6]。尽管地塞米松能够诱导生长激素细胞分化已经得到证实,但是对于地塞米松诱导生长激素细胞分化的过程的认识尚不清楚。研究发现,糖皮质激素受体(GR)本身虽是一种转录因子,但是并不直接调控 GH 基因转录^[7]。Bossis 等人证实^[8],在生

* 基金项目:黑龙江省教育厅基金项目(11513053)

作者简介:程玉(1971-),男,硕士生导师,副教授,主要研究方向:神经外科学,电话:0451-85555090,

E-mail: ccyy30@126.com

(收稿日期:2014-01-19 接受日期:2014-02-15)

长激素细胞分化的过程中,某种中间蛋白起了重要作用,Ras蛋白或其蛋白复合物是糖皮质激素诱导生长激素细胞分化过程中存在的关键蛋白。而Ras蛋白是一种与膜结合的G-蛋白,通常与膜结合受体的信号转导有关相关^[7]。

因此我们认为,在糖皮质激素诱导生长激素细胞分化的过程中,存在着某种中间蛋白,该中间蛋白可能是Ras蛋白本身,也可能是通过Ras信号系统发挥作用的其他蛋白。本实验通过在地塞米松诱导垂体生长激素细胞分化的过程中加入不同浓度中间蛋白Ras的抑制剂Manumycin,特异性抑制Ras蛋白的作用,进而推断Ras是否为地塞米松体外诱导胚胎生长激素细胞分化的中间蛋白及其在诱导分化过程中的作用。

1 材料与方法

1.1 动物与试剂

SD大鼠购自哈医大二院动物实验中心[许可证号:SCXK(黑)SCXK(吉)2003-0001],地塞米松、Manumycin、Triton(Sigma, St. Louis, MO, USA),放免试剂盒购自解放军总医院东亚放免研究中心,兔抗大鼠GH多克隆抗体(Millipore公司),FITC标记山羊抗兔IgG(北京中杉金桥),horseradish peroxidase-conjugated goat anti-rabbit antibody(Bio-Rad, Hercules, CA)。

1.2 方法

1.2.1 大鼠胚胎垂体组织的分离、细胞悬液的制备 将合笼后的雌性SD大鼠第二天清晨行阴道内精子涂片检查,以发现精子为受孕第0天,待孕鼠受孕第18天(E18)时,进行脱颈椎处死。无菌条件下取出胎鼠。分离垂体制成单细胞垂体细胞悬液。进行细胞计数,并调整细胞悬液细胞浓度在 $2 \times 10^5/\text{mL}$ 。

1.2.2 原代细胞分组培养 将用多聚赖氨酸包被的盖玻片分置于12孔板内,将垂体的单细胞悬液按 $2 \times 10^5/\text{mL}$ 的密度稀释,吸取垂体细胞100 μL 置于盖玻片上,孵化45分钟后,加入含有Dex(50 nmol/L)的基础培养液(基础培养液为含有谷氨酰胺和青、链霉素的DMEM培养液,作为对照组),培养液的最终容量为2 mL,培养时间为48 h。在第36 h,将不同浓度的Ras蛋白的抑制剂Manumycin(0.5、5和50 nmol/L)分别加入到含有Dex的培养液中,再继续培养12 h。至第48 h取上清液,利用放射免疫分析测定GH含量,洗脱细胞后利用免疫荧光法测定GH阳性细胞占总的垂体细胞的百分比。为测定Dex对胚胎垂体细胞是否有增殖作用,将垂体细胞按 $3 \times 10^5/\text{mL}$ 制成细胞悬液,根据培养液成分分成三组,第一组为基础培养液,第二组为50 nmol/L Dex,第三组为 10^{-6} mol/L碱性成纤维生长因子,培养48 h后用MTT法测定活细胞百分比。为测定Manumycin对Ras磷酸化表达的作用,调整细胞浓度为 $1 \times 10^6/\text{mL}$,以基础培养液对照组,50 nmol/L Dex(培养48 h),50 nmol/L Dex(培养36 h)+5 nmol/L Manumycin(12 h)。western-blot技术分别定量细胞内Ras、GTP-Ras含量,并且根据蛋白含量计算磷酸化比例。

1.2.3 免疫荧光 取出盖玻片,4%多聚甲醛固定20 min,采用免疫过氧化物酶染色,一抗为兔抗大鼠GH多克隆抗体(1:200),阴性对照用PBS(0.01 mmol/L pH7.4)代替一抗,滴加1:100荧光标记二抗(FITC标记山羊抗兔IgG)均匀覆盖盖片底,用PBS液洗3次,每次5分钟后甘油封片。荧光显微镜下绿色荧光圆环围绕的圆形或椭圆形细胞鉴定为GH阳性细胞。每张片取4

个视野,计算GH阳性细胞占总垂体细胞的百分比。

1.2.4 放射免疫分析 利用 γ -液闪计数器对培养上清液中GH放射性进行测量,数据处理模式用B/BO-IgX计算回归方程,样品GH含量依据其B/BO值,由回归计算得到。

1.2.5 Western Blot 细胞干预48 h后用细胞刮刀刮下细胞,用PBS冲洗下来, $16000 \times g$ 离心15 min,弃上清,将细胞沉淀置于 -70°C 冰箱备用。进行蛋白浓度测定,Protein yield was quantified using the BCA protein assay kit [2](Pierce-Perbio, Cramlington, UK)。上样30 μg ,SDS-PAGE恒压电泳。分离并转至PVDF膜。电压95 V, 4°C 封闭过夜。按0.1 mL $\cdot\text{cm}^2$ 膜面积杂交一抗,30 $^\circ\text{C}$ 2小时杂交二抗后室温下摇床杂交1 h,漂洗后加显色剂氯化硝基四氮唑蓝5 min,显色条带经1200Pro型图像扫描仪扫描。蛋白条带灰度值分析采用Quantity One软件。以GTP-Ras/总Ras比值表示磷酸化水平。实验重复进行三次。

1.2.6 MTT法测定细胞增值率 取对数生长期细胞制成 $3 \times 10^5/\text{mL}$ 的细胞悬液,接种于96孔培养板内,每孔100 mL,设8个复孔。按实验处理分组,每组设8个复孔,调零孔加100 mL培养液,继续培养。培养结束前4 h每孔吸去上清液,加100 mL浓度0.5 mg/mL MTT培养4 h,调零孔不加MTT,吸去全部上清液,然后每孔加200 mL DMSO,震荡摇匀,使结晶充分溶解。酶联免疫检测仪测每孔吸光度(检测波长490 nm),根据光度测量方法记录相对活细胞数。

1.2.7 统计学处理 所有实验数据采用均数 $\pm$ 标准差表示,采用GraphPad Prism5统计学软件对实验数据进行统计分析,采用方差分析,对组间差异进行t检验,以 $P < 0.05$ 认为有差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Manumycin对Dex诱导GH细胞分化的影响

为确定Ras蛋白在生长激素细胞分化中的作用,我们在Dex体外诱导生长激素细胞分化的过程中,加入不同浓度的Ras蛋白抑制剂Manumycin(0.5、5和50 nmol/L)。结果发现Manumycin能够有效降低GH阳性细胞百分比及GH的分泌量,并且具有一定的量效关系。随着Manumycin浓度的增加,Dex诱导的GH(+)细胞所占的百分比逐渐减少,同时GH的分泌量也相应的减少。但是,当Manumycin为50 nmol/L时,与Manumycin为5 nmol/L相比,GH(+)细胞百分比以及GH分泌量并没有显著变化($P > 0.05$)(表1)。

2.2 Dex与bFGF对胚胎垂体细胞增殖的影响

为证实Dex能够增加生长激素细胞百分比和GH分泌是通过诱导生长激素细胞分化而不是通过增殖作用,我们将胚胎垂体细胞分别用基础培养液、含有50 nmol/L Dex或 10^{-6} mol/L bFGF的培养液培养48 h,发现bFGF能显著增加胚胎垂体细胞的数量($P < 0.01$),而Dex不能增加细胞的数量(表2)($P > 0.05$)。从而排除了Dex对垂体细胞的增殖作用。

2.3 Manumycin对Ras磷酸化的影响

该实验的目的图1所示:Dex不能增加Ras蛋白总量,但能明显增加Ras的磷酸化表达水平。在加入Manumycin抑制剂后,Ras的磷酸化表达水平均显著降低($P < 0.01$)。

表 1 不同浓度 Manumycin 对 Dex 诱导 GH(+)细胞百分比和 GH 分泌量的影响

Table 1 Effect of different concentrations of Manumycin on Dex-induced GH(+) cell frequency and GH secretion

分组 Grouping	GH 细胞百分比(%) Percentage of GH cells(%)	GH 分泌量(ng/mL) GH secretion(ng/mL)	垂体细胞总数(10 ⁵ /mL) The total number of pituitary cells (10 ⁵ /mL)
A	6.35± 0.37	6.95± 0.28	213.75 ± 14.5
B	14.18 ± 0.74 [†]	18.61 ± 0.47	212.00 ± 13.98
C	13.64 ± 0.97 [†]	17.27 ± 0.78	208.25 ± 10.05
D	9.24 ± 0.58 ^{†‡§}	12.45 ± 0.71 ^{†§}	205.00 ± 12.88
E	8.94 ± 0.80 ^{†§*}	11.47 ± 0.90 ^{†§*}	207.25 ± 9.95

* 注:A,B,C,D,E 分别代表对照组,Dex 组,Dex+0.5 组,Dex+5 组,Dex+50 组。[†]P<0.05,与对照组相比;[‡]P<0.05,与 Dex 相比;[§] P<0.05,与 Dex + 0.5 组相比;^{*} P>0.05,与 Dex + 5 组相比。

Note: A,B,C,D,E represents the control group, Dex group, Dex +0.5 group, Dex +5 group, Dex +50 group. Compared [†]P <0.05, with the control group; [‡] P <0.05, compared with Dex; [§] P <0.05, compared to Dex + 0.5 group; ^{} P > 0.05, compared to Dex + 5 groups.

表 2 Dex 与 bFGF 对胚胎垂体细胞增殖的影响

Table 2 Effect of Dex and bFGF on embryonic pituitary cell proliferation

分组 (Grouping)	胚胎垂体细胞的数量 (The number of embryonic pituitary cells)
A	100.00± 0.00
B	99.50± 7.77*
C	149.00± 10.42 [*]

* 注:A,B,C 分别代表对照组,Dex 组, bFGF 组,胚胎垂体细胞在含有 Dex(50 nmol/L)或 bFGF(10⁻⁶ mol/L)的培养液中培养 48 h, bFGF 能显著增加胚胎垂体细胞的数量(^{*} P<0.01),而 Dex 不能增加胚胎垂体细胞的数量(^{*} P>0.05)。

Note: A,B,C represents the control group, Dex group, bFGF group, embryonic pituitary cells containing Dex (50 nmol / L) or bFGF (10⁻⁶ mol / L) in the culture medium cultured 48 h, bFGF can significantly increase the number of embryonic pituitary cells (^{} P <0.01), while Dex does not increase the number of fetal cells in the pituitary (^{*} P > 0.05).

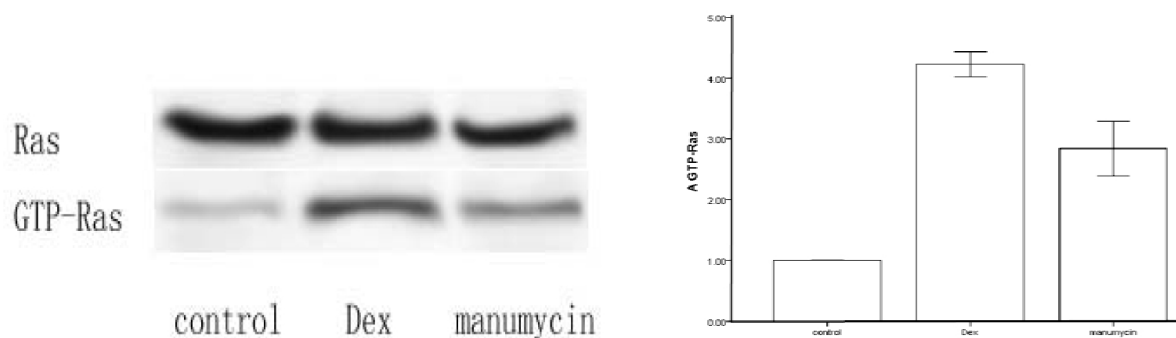


图 1 Manumycin 对 Ras 蛋白磷酸化的影响

Fig.1 The impact of Manumycin on the Ras protein phosphorylation

* 注:Dex 能明显增加 Ras 的磷酸化表达水平。在加入 Manumycin 抑制剂后,Ras 的磷酸化表达水平均显著降低(^{*} P<0.01 与对照组相比,^{*} P<0.01 与 Dex 相比)。

* Note: Dex significantly increased the expression level of phosphorylation of Ras. After addition of Manumycin inhibitors, Ras phosphorylation expression levels were significantly reduced (^{*} P <0.01 compared with control group, ^{*} P <0.01 compared with Dex).

3 讨论

大鼠胚胎垂体生长激素细胞的分化在下丘脑 - 垂体 - 肾上腺轴和下丘脑 - 垂体 - 甲状腺轴的调节下可以分为两个阶段^[8]: 第一阶段是生长激素细胞的早期分化,发生在大鼠胚胎 E19 之前。这一时期 Pit-1 阳性垂体祖细胞分化为生长激素细胞,生长

激素细胞数量明显增加,生长激素分泌量增加不明显。在第二阶段是 E19 以后,生长激素细胞的分化成熟。整个分化过程受到各种细胞内和细胞外因子的影响。目前基础实验已经证实:糖皮质激素、甲状腺激素、NO、维甲酸、盐皮质激素、热休克蛋白 -90(HSP-90)^[9]等均可诱导生长激素细胞的分化。

在胚胎早期的发育过程中,糖皮质激素分别是由母体本身

通过胚胎胎盘和肾上腺组织提供,最初能够在胚胎发育的第16天(E16)检测到。最大分泌量出现在第19天(E19)。同时,生长激素细胞在E19时期也急剧增加,提示糖皮质激素的体内浓度变化影响着生长激素细胞的分化^[9]。作为糖皮质激素的代表,我们的早期实验结果也已经证实了,地塞米松能够在体外诱导胎鼠生长激素细胞发生分化,并且只有在地塞米松达到5 nmol/L浓度时才开始起作用^[9]。在本实验中,我们选择生长激素细胞分化活跃的E18时期的胎鼠垂体细胞,通过加入地塞米松(50 nmol/L)诱导后,生长激素阳性细胞百分比以及生长激素的分泌量都有显著提高,这说明了在体外实验中,细胞外界加入的地塞米松通过了某种信号转导通路,将胞外的刺激信号转移至细胞内,从而引起了生长激素细胞的分化以及生长激素的分泌过程。

Bossis I等人通过在地塞米松诱导生长激素细胞分化的过程中,加入PKA和PKC蛋白的激活剂和抑制剂进行预处理后,发现诱导分化效果并没有受到影响。同时通过加入Ras-GTPase蛋白特异性抑制剂手性霉素(Manumycin)预处理后,地塞米松诱导生长激素细胞分化的作用明显减弱。因此Bossis I等人首先排除了与PKA和PKC有关的信号转导通路,初步推断以Ras蛋白介导的信号转导通路可能是地塞米松诱导生长激素细胞分化的信号转导通路^[11]。

Ras蛋白作为一种多功能性细胞因子,参与细胞内多种信号转导通路。在Ras蛋白从胞浆转移定位到胞膜的过程中,依次经过转录、翻译和修饰后转变成成为具有生物活性的形式,从而启动下游途径。本实验通过加入Ras蛋白抑制剂Manumycin发现,Dex诱导大鼠胚胎垂体GH细胞的分化作用减弱,并呈现一定的量效关系。这个结果提示我们,Ras蛋白可能是Dex诱导GH细胞分化的中间蛋白之一。

另外,在正常情况下,位于细胞膜内侧面的Ras蛋白可与GTP/GDP结合,并且具有较高的亲和力。胞内的Ras蛋白大多处于Ras-GDP状态,当它受到外界刺激时,GTP取代GDP与Ras结合生成活化的Ras-GTP状态。激活后的Ras蛋白可以与其相应的下游效应分子作用,从而调控各种信号的传递^[12]。Manumycin具有较强特异性的法尼基转移酶抑制作用,它通过阻断Ras蛋白的法尼基化修饰以及Ras蛋白结合定位于细胞膜内侧,使其不具有生物学活性^[13]。我们的实验证实,在Manumycin抑制Ras蛋白的过程中,Ras总蛋白的含量并没有明显变化,但是活化的Ras蛋白,即GTP-Ras的含量显著减少($P<0.01$)。这表明,Manumycin在抑制了Ras蛋白的法尼基化修饰后,降低了磷酸化的Ras蛋白,使得Dex诱导GH细胞的分化和GH分泌的作用减弱。总之,我们的实验结果证实Ras蛋白在地塞米松诱导垂体生长细胞分化过程发挥重要作用,但是其具体机制还尚不清楚。目前已知Ras信号转导通路的下游转导通路主要有MAPK家族(ERK1/EK2, JNK1/JNK2^[14-16]和p38 MAPK^[17-19])、PI3K/Akr和FAK蛋白^[20],Ras蛋白究竟是通过下游那些蛋白发挥作用,我们将今后继续研究,这将进一步认识糖皮质激素诱导垂体生长激素细胞分化的机制。

综上所述,本实验运用了免疫荧光、放免分析和western blot等实验方法,首次证实了Ras在糖皮质激素诱导GH细胞分化中的重要作用,从而初步推断出在糖皮质激素诱导生长激

素细胞分化的过程中,可能存在一种或多种中间蛋白,通过Ras信号转导通路发挥作用,这对于系统的研究糖皮质激素诱导GH细胞分化的机制奠定了基础。

参考文献 (References)

- [1] Paul Godfrey, Jason O R, Wesley G, et al. GHRH receptor of little mice contains a missense mutation in the extracellular domain that disrupts receptor function[J]. *Nature Genetics*, 1993, 4(3):227-232
- [2] Morriyam, Tagami T, Usui T. Antithyroid drugs inhibit thyroid hormone receptor-mediated transcription [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2007, 92(3):1066-1072
- [3] Liu L, T E Porter. Endogenous thyroid hormones modulate pituitary somatotroph differentiation during chicken embryonic development [J]. *Journal of Endocrinology*, 2004, 180(12): 45-53
- [4] Odoropoulou M. Novel medical therapies for pituitary tumors[J]. *Front Horm Res*, 2010, 158(9):158-164
- [5] Chen HP, Zhang L, Xu BH, et al. Nitric oxide stimulates embryonic somatotroph differentiation and growth hormone mRNA and protein expression through a cyclic guanosine monophosphate-independent mechanism[J]. *Tissue and Cell*, 2009, 4(34):133-140
- [6] 程玉, 胡志强, 初明, 等. 地塞米松体外诱导大鼠胚胎垂体生长激素细胞的实验研究[J]. *中国微侵袭神经外科杂志*, 2005, 4(10):176-179
- [7] Cheng Yu, Hu Zhi-qiang, Chu Ming. et al. Experimental study of dexamethasone in vitro embryonic cells of rat pituitary growth hormone[J]. *Chinese Minimally Invasive Neurosurgery*, 2005, 4(10):176-179
- [7] Bossis I, Porter TE. Evaluation of glucocorticoid-induced growth hormone gene expression in chicken embryonic pituitary cells using a novel in situ mRNA quantitation method [J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2003, 201(1-2): 13-23
- [8] Mogi C, Goda H, Mogi K. Multistep differentiation of GH-producing cells from their immature cells[J]. *J Endocrinol*, 2005, 184(1):41-50
- [9] Kurt D. Dittmar, Damon R. Demady, Louis F. Stancato, et al. Folding of the glucocorticoid receptor by the heat shock protein (hsp) 90-based chaperone machinery. The role of p23 is to stabilize receptor.hsp90 heterocomplexes formed by hsp90.p60. hsp70[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 1997, 272(8):21213-21220
- [10] Boudouresque F, Guillaume V, Strbak V, et al. Maturation of the pituitary-adrenal function in rat fetuses [J]. *Neuroendocrinology*, 1988, 48(4): 417-422
- [11] Bossis I, Porter TE. Evaluation of glucocorticoid-induced growth hormone gene expression in chicken embryonic pituitary cells using a novel in situ mRNA quantitation method [J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2003, 201(1-2):13-23
- [12] Buday L, Downward J.Many faces of Ras activation [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2008,1786(2): 178-187
- [13] Pan J, Chen B, Suc H, et al. Autophagy induced by farnesyltransferase inhibitors in cancer cells[J]. *Cancer Biol Ther*, 2008, 7(10): 1679-1684
- [14] 倪虹, 杨茂, 刘文欣, 等. 非小细胞肺癌K-ras突变小分子对吉非替尼耐药细胞的作用[J]. *中华实验外科杂志*, 2011, (6):961-963
- Ni Hong, Yang Mao, Liu Wen-xin, et al. Non-small cell lung cancer K-ras mutations's function in small molecules gefitinib-resistant cells [J]. *Chinese Journal of Experimental Surgery*, 2011, (6):961-963

- [9] Szumowski P, Abdelrazek S, Mojsak M, et al. Parathyroid gland function after radioiodine (131I) therapy for toxic and non-toxic goitre[J]. Endokrynol Pol, 2013, 64(5):340-345
- [10] Li Y, Kim J, Diana T, et al. A novel bioassay for anti-thyrotrophin receptor autoantibodies detects both thyroid-blocking and stimulating activity [J]. Clin Exp Immunol, 2013, 173(3):390-397
- [11] BW, Buckle AM, Dunn-Walters D, et al. Yersinia enterocolitica provides the link between thyroid-stimulating antibodies and their germline counterparts in Graves' disease [J]. J Immunol, 2013, 190(11): 5373-5381
- [12] Ignjatovic VD, Matovic MD, Vukomanovic VR, et al. Is there a link between Hashimoto's thyroiditis and primary hyperparathyroidism A study of serum parathormone and anti-TPO antibodies in 2267 patients[J]. Hell J Nucl Med, 2013, 16(2):86-90
- [13] Lewis A, Atkinson B, Bell P, et al. Outcome of 131I therapy in hyperthyroidism using a 550MBq fixed dose regimen[J]. Ulster Med J, 2013, 82(2): 85-88
- [14] Saravanan P, Dayan CM. Thyroid autoantibodies [J]. Endocrinol Metab Clin North Am, 2001, 30(2):315-337
- [15] Ayturk S, Demir MV, Yaylac S, et al. Propylthiouracil induced leukocytoclastic vasculitis: A rare manifestation [J]. Indian J Endocrinol Metab, 2013, 17(2):339-340
- [16] Aranha AA, Amer S, Reda ES, et al. Autoimmune thyroid disease in the use of alemtuzumab for multiple sclerosis: a review [J]. Endocr Pract, 2013, 19(5):821-828
- [17] Amashukeli M, Korinteli M, Zerekidze T, et al. The negative correlation between thyrotropin receptor-stimulating antibodies and bone mineral density in postmenopausal patients with Graves' disease[J]. J Investig Med, 2013, 61(5): 842-847
- [18] Inaba H, Moise L, Martin W, et al. Epitope recognition in HLA-DR3 transgenic mice immunized to TSH-R protein or peptides [J]. Endocrinology, 2013, 154(6): 2234-2243
- [19] Galili U. Anti-Gal: an abundant human natural antibody of multiple pathogenesis and clinical benefits [J]. Immunology, 2013, 140(1): 1-11
- [20] Sinha A, Abinun M, Gennery AR, et al. Graves' immune reconstitution inflammatory syndrome in childhood [J]. Thyroid, 2013, 23(8): 1010-1014

(上接第 3231 页)

- [15] 李君牧, 廖端芳. 机械应激的血管生物学意义与动脉粥样硬化[J]. 国际病理科学与临床杂志, 2008, 28(3):217-219
Li Jun-mu, Liao Duan-fang. Biological significance of vascular atherosclerosis mechanical stress and atherosclerosis [J]. International Journal of Pathology and Clinical Science, 2008, 28(3): 217-219
- [16] 李淑萍, 张宗玉, 童坦君. 衰老细胞相关信号传递系统 [J]. 实用老年医学, 2002, 16(2):60-64
Li Shu-ping, Zhang Zong-yu, Tong Tan-jun. Senescent cells associated signaling systems[J]. Practical Geriatrics, 2002, 16(2):60-64
- [17] H Li, W Wang, X Liu, et al. Transcriptional factor HBP1 targets P16INK4A, upregulating its expression and consequently is involved in Ras-induced premature senescence [J]. Oncogene, 2010, 29(2): 5083-5094
- [18] Mi-Sung Kim, Eun-Jung Lee, Hyeon-Reh Choi Kim. p38 Kinase Is a Key Signaling Molecule for H-Ras-induced Cell Motility and Invasive Phenotype in Human Breast Epithelial Cells [J]. Cancer Res, 2003, 63(1): 5454-5459
- [19] 何凌峰, 侯树坤, 管考鹏, 等. 热休克蛋白 70 mRNA 在膀胱癌中的表达及与细胞凋亡的关系 [J]. 中华泌尿外科杂志, 2004, 25(6): 374-376
He Ling-feng, Hou Shu-kun, Guan Kao-peng, et al. Heat shock protein 70 mRNA expression in bladder cancer and its relationship with apoptosis[J]. Chinese Journal of Urology, 2004, 25(6): 374-376
- [20] Cook SJ, AziZ N, Mc Mahon M. The repertoire of fos and jun protein expressed during the G1 phase of the cell cycle is determined by the duration of the mitogen-activated protein kinase activation[J]. Mol Cell Biol, 1999, 19(1): 330-341