

乙肝病毒 X 蛋白通过激活 NF- κ B 信号通路上调 ABCG2 的表达

任 利 樊海宁 邓 勇 王海久 阳丹才让 张 鹏 王 展

(青海大学附属医院肝胆胰外科 青海 西宁 810001)

摘要 目的:研究乙肝病毒 X 蛋白(HBx)通过核因子- κ B(NF- κ B)信号通路对半转运蛋白(ABCG2)的调节作用。方法:用特异性的 NF- κ B 信号通路阻断剂 PDTC 阻断 NF- κ B 信号通路,荧光双标激光扫描共聚焦显微镜观察 L02 细胞系转染 HBx 基因前后及 PDTC 加入前后 NF- κ B 信号通路的激活、失活情况,同时用 Real-time PCR 和 Western Blot 技术检测转染前后及 PDTC 加入前后 ABCG2 在 mRNA 及蛋白水平的表达变化。结果:以 L02 细胞为参照,转染 HBx 基因后的 L02-HBx 细胞 NF- κ B 信号通路被激活,ABCG2 mRNA 和蛋白水平分别增加 3.62 ± 0.15 和 4.61 ± 0.73 倍,差异有统计学意义($P < 0.05$)。PDTC 作用 24h 后 L02/HBx 细胞 NF- κ B 信号通路阻断,ABCG2 mRNA 和蛋白表达分别为 2.15 ± 0.32 倍和 2.37 ± 0.55 倍,与未加入 PDTC 作用的 L02-HBx 细胞相比均有统计学意义($P < 0.05$)。结论:NF- κ B 信号通路是 HBx 上调 ABCG2 表达的途径之一。

关键词:乙型肝炎病毒 X 蛋白;半转运蛋白 ABCG2;核因子- κ B;信号通路;肝癌

中图分类号:R512.62 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2011)12-2247-04

Hepatitis B virus X Protein Induces ABCG2 Expression by Activation of NF- κ B Signaling Pathway

REN Li, FAN Hai-ning, DENG Yong, WANG Hai-jiu, YANGDAN Cai-rang, ZHANG Peng, WANG Zhan

(Hepatobiliary surgery, Affiliated Hospital of Qing Hai University, Xining, Qinghai, 810001, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the effect of HBx on ABCG2 by NF- κ B signaling pathway. **Methods:** NF- κ B signaling pathway blocker PDTC was blocked by PDTC. Laser scanning confocal microscopy was applied to detect the activation and deactivation of NF- κ B signaling pathway. Real-time PCR and Western Blot were used to detect the expression of ABCG2. **Results:** The NF- κ B signaling pathway of Lo2-HBx cells was activated after transfection with HBx gene compared with control Lo2 cells. The mRNA and protein of ABCG2 in Lo2-HBx cells increased 3.62 ± 0.15 and 4.61 ± 0.73 times respectively. This difference had statistical significance ($P < 0.05$). But the mRNA of ABCG2 decreased to 2.15 ± 0.32 , while the expression of ABCG2 reduced to 2.37 ± 0.55 ($P < 0.05$), when the NF- κ B signaling pathway was blocked by 50μ M PDTC for 24h respectively. **Conclusion:** NF- κ B signaling pathway is one of the way for HBx to up-regulate the expression of ABCG2.

Key Words: HBx; ABCG2; NF- κ B; Signaling pathway; Hepatocellular

Chinese Library Classification(CLC): R512.62 **Document code:**A

Article ID:1673-6273(2011)12-2247-04

前言

原发性肝细胞癌是当今世界上最常见的恶性肿瘤之一。近年来,肝癌的治疗水平有了长足的发展,手术治疗及各种微创治疗手段的不断发展,极大提高了肝癌的疗效。然而,与其它恶性肿瘤相比,作为癌症治疗的主要手段之一的化疗对于肝癌治疗效果有限,其主要原因是多药耐药(multidrug resistance, MDR)的问题。ABCG2 是近年发现的与肿瘤多药耐药有关的新的药物排出泵,研究表明乙肝病毒 X 蛋白(HBx)可上调肝癌细胞耐药相关基因 P-gp、MRP 的表达^[1],是否同时可以促进 ABCG2 的表达,其具体机制如何尚未见报道。NF- κ B 是一类功能广泛的核转录调控元件,被激活后可以调控多种基因的转录和翻译^[2],本文针对 HBx 是否可以通过激活 NF- κ B 通路来影响肝细胞 ABCG2 的表达进行研究。

1 材料和方法

作者简介:任利, Tel:13897200190; E-mail:renliweimin_xn@126.com

(收稿日期 2011-01-06 接受日期 2011-01-28)

1.1 材料和仪器

正常人肝 L02 细胞系由青海大学医学院高原实验中心保存, L02-HBx 细胞系由华中科技大学附属同济医院肝脏外科实验中心馈赠。DMEM、胎牛血清购于 Hyclone 公司。2 $\times$ sybrGreen Mix 购自 TOYOBO 公司,鼠抗人 HBx 单克隆抗体购于 CHEMICON 公司,兔抗多克隆抗体 β -action、鼠抗人 NF- κ B 单克隆抗体和鼠抗人 ABCG2 单克隆抗体购于 Santa Cruze 公司,羊抗鼠 FITC-IgG 抗体和 PDTC 购于 Sigma 公司,PCR 引物由上海生工合成。荧光双标激光扫描共聚焦显微镜为 NIKON 公司产品,荧光定量聚合酶链反应(PCR)仪(7000 型)为美国 ABI 公司产品。

1.2 方法

1.2.1 稳定表达乙型肝炎病毒 X 蛋白的 L02 细胞系的鉴定 将 L02-HBx 细胞系通过细胞爬片,免疫细胞化学进行鉴定,将 L02 细胞和 L02-HBx 细胞分别接种于载玻片上,37 $^{\circ}$ C 细胞培养箱中培养 48h 后取出, PBS 清洗三次,丙酮+甲醇(1:1)固定 30min,正常羊血清封闭 30min 后,加入 1:100 倍稀释的 HBx 鼠抗人单克隆抗体,4 $^{\circ}$ C 孵育过夜后, PBS 洗三次,然后加入羊

抗鼠二抗,室温孵育 30min, PBS 洗三次后 DAB 显色,中性树脂封片,显微镜下观察并拍照。

1.2.2 荧光双标激光扫描共聚焦显微镜检查观察转染前后及 PDTC 加入前后 NF- κ B 信号通路激活失活情况 将爬片细胞分为三组 L02 细胞组, L02-HBX 细胞组, 50 μ mol 的 PDTC 作用 24h 的 L02-HBX 细胞组。PDTC 待细胞贴壁后加入,作用 24h 后取出, PBS 洗三次, 丙酮 + 甲醇(1:1)固定 10min, PBS 洗三次, 0.25% Triton-X100 处理 10min, 正常羊血清封闭 30 分钟后加入 NF- κ B 单克隆抗体 (1:100), 4 $^{\circ}$ C 冰箱过夜, 滴加羊抗鼠 FITC-IgG 抗体(1:500 稀释, 美国 Sigma), 常温孵育 30min, PI 染核 5min。采用 Nikon Digital ECLIPSE CI 共聚焦显微镜进行荧光双标观察, 以 488 nm、543nm 双波长氩-氦激光激发样品, 激发能量为 10%。

1.2.3 Real-time PCR 技术检测转染前后及 PDTC 加入前后 L02 细胞中 ABCG2 mRNA 的表达 收获对数期生长的上述三组细胞, 提取细胞总 RNA, 测 RNA 的浓度和纯度。取相同量的 mRNA 逆转录为 cDNA。每组 cDNA 均以基因引物加荧光染料复合物 sybrGreen Mix(2*)进行定量 PCR 反应, 每个反应做 3 个复孔。经预实验, 将逆转录的 cDNA 稀释 5 倍为模板。ABCG2 引物序列由上海生工合成, 上游 5' -TCTGGAGGA-GAAAGAAAAGGACT-3', 下游: 5' -GGCTGATGAATG-GAGAAGATGAT-3'。内参照 β -actin 引物序列为: 上游 5' -AGAGGGAAATCGTGCGTGAC-3', 下游 5' -CAATAGT-GATGACCTGGCCGT-3'。总反应体系为 25 μ l sybrGreen Mix 12.5 μ l cDNA 模板 2 μ l, 10 μ M 上游引物和 10 μ M 下游引物各 1 μ l, ddH₂O 8.5 μ l。反应条件 94 $^{\circ}$ C 变性 1min, 40 次循环内 94 $^{\circ}$ C 变性 60s, 55 $^{\circ}$ C 退火 60s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 60s, 72 $^{\circ}$ C 再延伸 10min。反应完成后在 ABI7000 软件系统中调整基线和阈值, 读出各反应孔 Ct 值。基因表达水平差异的比较: 变化倍率 = $2^{-\Delta\Delta C_t}$, $\Delta C_t = (C_t \text{ 目的基因} - C_t \text{ 内参基因}) / (C_t \text{ 阴性对照} - C_t \text{ 内参基因})$ 。

1.2.4 Western Blot 检测转染前后及 PDTC 加入前后 L02 细胞中 ABCG2 蛋白的表达 收获长满瓶的上述三组细胞, 用三去污裂解液提取细胞总蛋白, 应用考马氏亮兰 R250 法测定蛋白浓度。制备 10%的 SDS-聚丙烯酰胺分离胶, 4%的积层胶。以每泳道加入 50 μ g 蛋白量计算上样量, 在其内加入 5 $\times$ 上样缓冲液 (loading buffer), 沸水浸煮 8min 变性后加样。垂直电泳条件: 积层胶, 60V 40min, 分离胶, 100V 90min, 确定溴酚蓝到达凝胶的底部。然后, 将目的蛋白转至 PVDF 膜上。ABCG2 转膜条件: 恒定电流 200mA 70min, 内参 β -action 转膜条件: 恒定电流 200mA 40min。丽春红染膜, 确认转膜效果后, 5%的脱脂奶粉室温下封闭 7h。加入鼠抗人 ABCG2 单克隆抗体, 工作浓度 1:500, 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。洗膜 3 次后, HRP 标记的兔抗鼠二抗, 工作浓度 1:5000, 室温孵育 2h 后, 洗脱二抗, ECL 显色。应用 Western blot 图象分析软件, 结果以测定的 ABCG2 蛋白条带的积分光密度 (IOD) 与 β -action 条带的光密度对比来表示组织 ABCG2 蛋白量的相对表达水平。

1.3 统计学分析

数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 应用 SPSS 11.5 版统计分析软件, 两组

间比较采用 t 检验, 多样本间的两两比较用单因素方差分析。P<0.05 表明差异有统计学意义。

2 结果

2.1 稳定表达乙型肝炎病毒 X 蛋白的 L02 细胞系的鉴定

乙型肝炎病毒 X 蛋白在 L02 细胞中阴性表达 (图 1A), 在 L02-HBX 细胞中阳性表达 (图 1B), 且主要位于胞浆中。

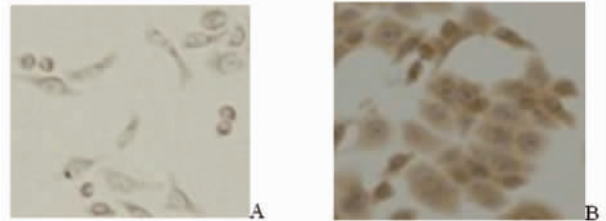


图 1 HBx 在 L02 和 L02-X 细胞中的表达: A L02 细胞, HBx 阴性表达。

B L02-X 细胞, HBx 阳性表达且主要位于细胞胞浆内 ($\times 200$)

Figure 1 in HBx L02 and L02 - X cells express: A L02 cell, HBx negative expression. B L02 - X cell, HBx masculine expression and the cytoplasm mainly in cells ($\times 200$)

2.2 荧光双标激光扫描共聚焦显微镜观察转染前后及 PDTC 加入前后 NF- κ B 信号通路激活失活情况

L02 细胞中 NF- κ B 主要位于胞浆内 (图 2a)。转染 HBx 质粒后 L02-HBx 细胞中 NF- κ B 被激活, 核内可见表达, 核内 NF- κ B 显示为绿色, PI 染核为红色, 绿色和红色叠加后为黄色 (图 2b)。加入 50 μ M PDTC 作用 24h 后, L02-HBx 细胞核中几乎没有 NF- κ B 的表达 (图 2c)。

2.3 Real-time PCR 技术检测转染前后及 PDTC 加入前后 L02 细胞中 ABCG2 mRNA 的表达情况

以 L02 细胞 ABCG2 mRNA 表达为参照, L02-HBx 细胞 ABCG2 mRNA 表达为其 3.62 $\pm$ 0.15 倍, 50 μ M PDTC 作用 24h 的 L02-HBx 细胞 ABCG2 mRNA 表达为其 2.15 $\pm$ 0.32 倍, 可见转染后 ABCG2 mRNA 表达明显上调 (P<0.05), 50 μ M PDTC 阻断 NF- κ B 信号通道后 ABCG2 mRNA 表达明显下调 (P<0.05) (图 3)。

2.4 Western Blot 检测转染前后及 PDTC 加入前后 L02 细胞中 ABCG2 蛋白的表达

以 L02 细胞 ABCG2 蛋白表达为参照, L02-HBx 细胞 ABCG2 蛋白表达为其 4.61 $\pm$ 0.73 倍, 50 μ M PDTC 作用 24h 的 L02-HBx 细胞 ABCG2 蛋白表达为其 2.37 $\pm$ 0.55 倍。可见转染后 ABCG2 蛋白表达明显上调 (P<0.05), 50 μ M PDTC 阻断 NF- κ B 信号通道后 ABCG2 蛋白表达明显下调 (P<0.05) (图 4)。

3 讨论

MDR 系指肿瘤对一种抗肿瘤药物出现耐药的同时, 对其他许多结构各异、作用机制不同的抗肿瘤药物亦产生交叉耐药现象。许多学者用体外模型已从各个方面研究了发生的机制 [3-5]。MDR 通常被认为与转运蛋白有关, 这些蛋白能以消耗的方式将药物从细胞内泵出细胞外。与 MDR 有关的转运蛋白包括 P-糖蛋白、多药耐药蛋白 (MRP, ABCC), 乳腺癌多药耐药

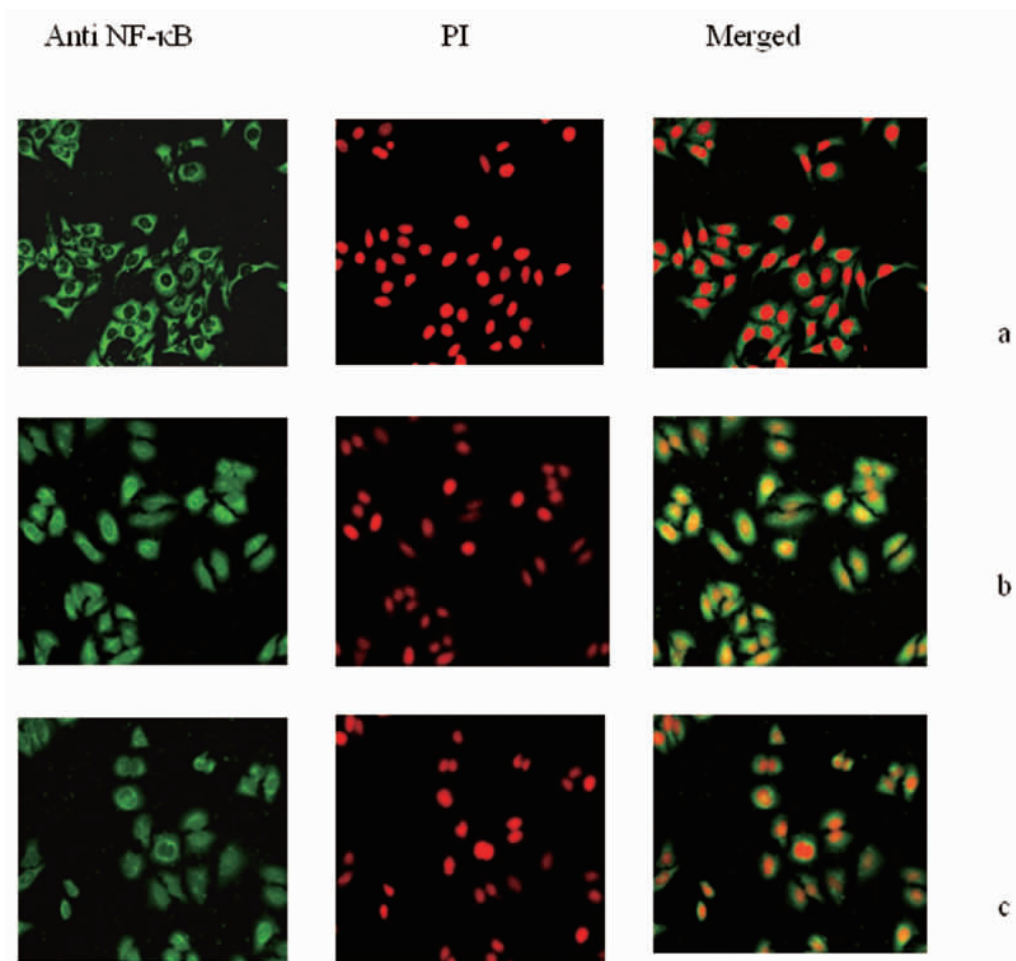


图 2 转染前后及 PDTC 加入前后 NF- κ B 信号通路激活活情况①L02 细胞 NF- κ B 主要位于胞浆内($\times 200$)②L02-X 细胞 NF- κ B 表达增强 , 且核内也可见表达($\times 200$)③加了 PDTC 的 L02-X 细胞 NF- κ B 表达减弱 核内表达明显减少($\times 200$)。

Figure 2 PDTC carrying around and around NF - κ B join signaling pathways activate cell inactivation situation (1) L02 cell, NF - κ B mainly in the cytoplasm($\times 200$), (2) L02 - X cells, NF - κ B strengthen expression, and in nuclear also visible expression($\times 200$), (3) Add the PDTC L02 - X cells, NF - κ B expression is abate, nuclear expressed in significantly less($\times 200$).

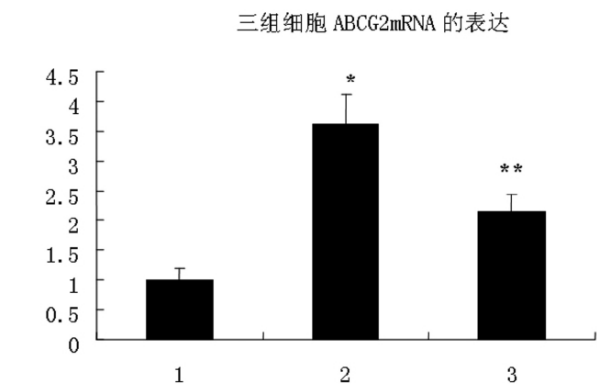


图 3 转染前后及 PDTC 加入前后各组细胞中 ABCG2 mRNA 的表达情况 :1、L02 细胞 2、L02-HBx 细胞 3、L02-HBx 细胞+50 μ mol/L PDTC。* 1 和 2 间差异有统计学意义($P<0.01$) ;* * 3 和 2 间差异有统计学意义($P<0.01$)。

Figure 3 PDTC carrying around and around in each cell join ABCG2 mRNA expression: 1, L02 cell; 2, L02 - HBX cell; 3, L02 - HBX cell+50 μ mol/L PDTC. * The difference between 1 and 2 with a statistical significance ($P<0.01$); * * 3 and the difference between 2 with a statistical significance ($P<0.01$).

蛋白(BCRP, ABCG2) 肺耐药相关蛋白(LRP)等 ,另外 ,尚有其

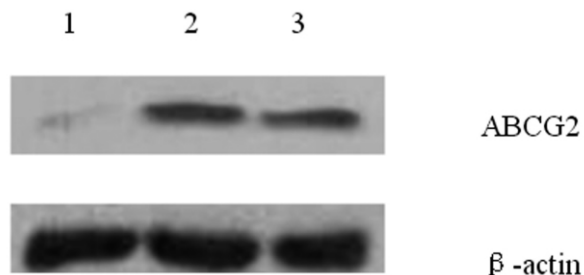


图 4 转染前后及 PDTC 加入前后各组细胞中 ABCG2 蛋白的表达情况 :1、L02 细胞 2、L02-HBx 细胞 3、L02-HBx 细胞+50 μ mol/L PDTC。

Figure 4 PDTC carrying around and around in each cell join ABCG2 protein expression : 1, L02 cell; 2, L02 - HBX cell; 3, L02 - HBX cell+50 μ mol/L PDTC.

他的机制参与了 MDR。这些蛋白在不同的组织中分布并不相同 ,其生理功能也不尽一样。简而言之 ,这些蛋白能转运许多结构不一样的化学毒物及其他毒素。ABC 转运蛋白主要分布在吸收功能强的组织(如肺及消化道) ,代谢与排泄组织(如肝、肾等) 。此外 ,这些蛋白在维持体内一些屏障结构的功能中起重要作用。ABCG2 是一种跨膜半转运蛋白,作为 ABC 转运体家族的成员之一,最初从乳腺癌细胞系中分离到^[6] ,是新发现的参与

肿瘤细胞的多药耐药性的半转运蛋白,与P糖蛋白和多药耐药蛋白(MRP)同属ABC转运蛋白超家族。与典型的ABC转运蛋白不同的是只含有一个ATP结合结构域和一个疏水性的跨膜结构域,因此称其为半转运蛋白。ABCG2广泛存在于正常组织内,在机体内承担着重要的生理功能,如维持干细胞的稳定性及组织细胞的稳态,在前列腺、睾丸的高表达对维持遗传的稳定性也不可或缺,在药物的吸收、分布和排泄过程中起着非常重要的作用^[7]。研究发现,低氧环境诱导ABCG2的高表达,推测实体瘤的低氧环境中ABCG2的上调可能增加药物的抗药性^[8]。ABCG2基因突变会导致药物耐受谱以及底物特异性的改变,对多种化疗药物外排,从而引起多药耐药,直接影响到临床预后^[9]。ABCG2基因多态性及ABCG2表达和功能的差异可导致不同群体或个体对某些疾病存在不同的易感性,是影响药物耐药及药物个体间差异的重要因素之一,也为临床合理用药提供理论和实践依据^[10]。目前认为ABCG2往往与其它耐药蛋白起协同作用,在有些临床耐药中甚至起主导作用。当前在恶性血液病中对ABCG2的临床耐药相关性的研究最多,并且在AML多发性耐药中所起的作用已得到了肯定^[11]。李高鹏等^[12]通过阿霉素浓度递增诱导建立HepG2/ADM耐药模型, HepG2/ADM ABCG2 mRNA表达为亲本细胞9倍,并且在蛋白水平也发现其高表达,提示了ABCG2的高表达是肝癌MDR机制的重要分子基础。

乙肝病毒X蛋白(HBX)作为一种多功能蛋白,它可通过调控基因表达和蛋白间相互作用,激活多条细胞信号转导通路,并可激活HIF-1 α 、NF- κ B、AP-1、SP1和oct-1等多种核转录因子,影响细胞的增殖、分化、凋亡,促进其恶性转化,促进肿瘤多药耐药的产生^[13-16]。NF- κ B是一类功能广泛的核转录调控元件,在细胞静息状态时,NF- κ B与它的抑制因子I κ B结合,以无活性形式存在于细胞质中。HBx通过活化IKK α 和IKK β 使的抑制因子I κ B磷酸化,进一步导致I κ B泛素化和蛋白酶体介导的降解反应,使NF- κ B从胞浆复合体中释放出来,移位至胞核,恢复其转录激活活性,进而转录激活相应靶基因^[17]。PDTC是NF- κ B特异性的抑制剂,可以通过稳定胞浆中的I κ B从而有效的抑制NF- κ B的活化和向细胞核内转移,阻断NF- κ B传导途径的信号传导^[18]。

游建^[19]等研究表明HBX蛋白可能通过促进多药耐药相关蛋白如LRP、MRP1、mdr1等的表达促进肝癌细胞MDR形成,但具体机制尚不明确。本研究基于HBx与肝癌多药耐药的相关性,提出HBx蛋白是否可以促进耐药基因ABCG2的表达,是否与NF- κ B信号通路有相关性的假设,通过HBx质粒转染,发现转染HBx基因后L02细胞中ABCG2 mRNA和蛋白水平明显上调,应用NF- κ B抑制剂PDTC后ABCG2 mRNA和蛋白生成明显减少,此结果表明HBx可以通过NF- κ B信号途径上调ABCG2的表达。同时我们也发现NF- κ B信号通路阻断后L02-HBx细胞中ABCG2的mRNA和蛋白水平仍然高于L02细胞,一方面可能是因为NF- κ B信号通路阻断不够彻底,另一方面NF- κ B信号通路可能只是HBx上调ABCG2表达的途径之一,还存在其他的信号调节通路。

综上所述,本实验提出并证实了NF- κ B信号通路是HBX上调ABCG2的重要途径之一,完善了肝细胞肝癌ABCG2升

高的调节机制。揭示了HBX和NF- κ B在肝癌发病中的重要意义,为通过阻断该信号传导途径治疗肝癌及逆转多药耐药提供了实验依据。

参考文献(Refereces)

- [1] 关剑,陈孝平,丁磊. 乙型肝炎病毒X蛋白与肝癌生物学特性的研究[J]. 中华实验外科杂志, 2004, 21: 1062-1064
GuanJian, Michael, DingLei, et al. Hepatitis b virus X protein liver cancer and the biological characteristics of research [J]. The experiment surgical magazine, 2004, 21: 1062-1064
- [2] Tegethoff S, Behlke J, Scheidereit C. Tetramerization of IkappaB kinase gamma (IKKgamma) is obligatory for IKK complex activity and NF-kappaB activation [J]. Mol Cell Biol, 2003, 23 (6): 2029-2041
- [3] Lage H, Dietel M. Multiple mechanisms confer different drug-resistant phenotypes in pancreatic carcinoma cells [J]. J Cancer Res Clin Oncol, 2002, 128: 349-357
- [4] Gariboldi MB, Ravizza R, Riganti L, et al. Molecular determinants of intrinsic resistance to doxorubicin in human cancer cell lines [J]. Int J Oncol, 2003, 22: 1057-1064
- [5] Bodo A, Bakos E, Szeri F, Varadi A, Sarkadi B. The role of multidrug transporters in drug availability, metabolism and toxicity [J]. Toxicol Lett, 2003, 140-141: 133-143
- [6] Doyle LA, Yang W, Abruzzo LV, et al. A multidrug resistance transporter from human MCF-7 breast cancer cells [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1998, 95(26): 15665-15670
- [7] Fetsch PA, Abati A, Litman T, et al. Localization of the ABCG2 mitoxantrone resistance-associated protein in normal tissues [J]. Cancer Lett, 2006, 235(1): 84-92
- [8] Krishnamurthy P, Ross DD, Nakanishi T, et al. The stem cell marker Bcrp / ABCG2 enhances hypoxic cell survival through interactions with heme [J]. J Biol Chem, 2004, 279(23): 24218-24225
- [9] Yanase K, Tsukahara S, Mitsuhashi J, et al. Functional SNPs of the breast cancer resistance protein-therapeutic effects and inhibitor development [J]. Cancer Lett, 2006, 234(1): 73-80
- [10] Urquhart BL, Ware JA, Tirona RG, et al. Breast cancer resistance protein (ABCG2) and drug disposition: intestinal expression, polymorphisms and sulfasalazine as an in vivo probe [J]. Pharmacogenet Genomics, 2008, 18(5): 439-448
- [11] 曲士强, 傅铮铮, 吴德沛. ABCG2与恶性血液病耐药相关性的研究进展 [J]. 中国实验血液学杂志, 2009, 17(2): 513-518
- [11] QuShiJiang, FuZhengZheng, WuDePei. ABCG2 with malignant haematology. The research progress of drug resistance correlation [J]. journal of China experimental hematology magazine, 2009, 17 (2): 513-518
- [12] 李高鹏, 陈孝平, 王其, 等. 多药耐药相关蛋白在肝癌多药耐药细胞系 HepG2/ADM 中的作用 [J]. 中华普通外科杂志. 2006, 21: 766-768
Li Gao-peng, Michael, WangQi, etc. The role of many drug resistance related proteins in liver cancer drug resistance HepG2/ADM lines [J]. The surgeon general magazine. 2006, 21: 766-768
- [13] Ohata K, Ichikawa T, Nakao K, et al. Interferon alpha inhibits the nuclear factor kappa B activation triggered by X gene product of hepatitis B virus in human hepatoma cells [J]. FEBS Lett, 2003, 553: 304-308

(下转第 2229 页)

的治疗作用,该方能显著增加去卵巢骨质疏松大鼠的骨密度,降低其血清 TRACP 和 β -CTX 水平。

参考文献(References)

- [1] 丁桂芝,金之欣.第四届国际骨质疏松症会议简况[J].中医学杂志,1993,73(8):507-508
Ding Gui-zhi, Jin Zhi-xin. Brief introduction of the fourth international osteoporosis conference[J]. National Medical Journal of China,1993,73(8):507-508
- [2] 黄宏兴,柴生颢,黄红,等.骨质疏松症中医证型的聚类分析[J].广州中医药大学学报,2007,24(3):180-183
Huang Hong-xing, Chai Sheng-ting, Huang Hong. Cluster Analysis of Syndrome Patterns of Osteoporosis in Traditional Chinese Medicine [J]. Journal of Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine, 2007,24(3):180-183
- [3] 刘石平,廖二元,伍汉文,等.绝经后骨质疏松大鼠模型的综合评价[J].湖南医科大学学报,2001,26(2):111-114
Liu Shi-ping, Liao Er-yuan, Wu Han-wen, et al. Comprehensive assessment of the ovariectomized rat model of postmenopausal osteoporosis [J]. Bulletin of Hunan Medical University, 2001,26(2):111-114
- [4] Kalu DN. The ovariectomized rat model of postmenopausal bone loss [J]. Bone Miner, 1991, 15(2):175-192
- [5] Siegel LC, Fu JC, Uto N. Collagen cross-linking: lysyl oxidase dependent synthesis of pyridinoline in vitro: confirmation that pyridinoline is derived from collagen [J]. J. Biochem Biophys Res Commun, 1982, 108(4): 1546-1550
- [6] Halleen JM, Alatalo SL, Jankila AJ, et al. Serum tartrate-resistant acid phosphatase 5b is a specific and sensitive marker of bone resorption[J]. Clin Chem, 2001,47(3):597-600
- [7] Nakasato YR, Jankila AJ, Halleen JM, et al. Clinical significance of immunoassays for type 5 tartrate-resistant acid phosphatase [J]. Clin Chem, 1999, 45(12): 2150-2157
- [8] Yamada S, Inaba M, Kurajoh M, et al. Utility of serum tartrate-resistant acid phosphatase (TRACP5b) as a bone resorption

marker in patients with chronic kidney disease: independence from renal dysfunction[J]. Clin Endocrinol (Oxf), 2008, 69(2): 189-196

- [9] 薛延,张海文,杨立红,等.血清骨特异性酸性磷酸酶的临床意义[J].中华内分泌代谢杂志,2003,19(6):48-49
Xue Yan, Zhang Hai-wen, Yang Li-hong, et al. Clinical significance of serum bone-specific acid phosphatase [J]. Chinese Journal of Endocrinology and Metabolism, 2003,19(6):48-49
- [10] Oxlund H, Mosekilde L, Ortoft G. Reduced concentration of collagen reducible cross links in human trabecular bone with respect to age and osteoporosis[J]. Bone. 1996,19(5):479-484
- [11] Garnero P, Sornay-Rendu E, Chapuy MC, et al. Increased bone turnover in late postmenopausal women is a major determinant of osteoporosis[J]. J Bone Miner Res. 1996,11(3):337-349
- [12] Fledelius C, Johnsen A, Cloos P, et al. Characterization of urinary degradation products derived from type I collagen [J]. J Biol Chem, 1997,272(15):9755-9763
- [13] Bonde M, Garnero P, Fledelius C, et al. Measurement of bone degradation products in serum using antibodies reactive with an isomeric form of an 8 amino acid sequence of the C-telopeptide of type I collagen[J]. J Bone Miner Res, 1997,12(7):1028-1034
- [14] Srivastava AK, MacFarlane G, Srivastava VP, et al. A new monoclonal antibody ELISA for detection and characterization of C-telopeptide fragments of type I collagen in urine [J]. Calcif Tissue Int, 2001,69(6):327-336
- [15] Huber F, Traber L, Roth HJ, et al. Markers of bone resorption-measurement in serum, plasma or urine? [J]. Clin Lab, 2003,49(5-6):203-207
- [16] Zoli A, Lizzolo MM, Capuano A, et al. Osteoporosis and bone metabolism in postmenopausal women with osteoarthritis of the hand [J]. Menopause, 2006, 13(3):462-466
- [17] 章少华,张咏梅.中医药治疗骨质疏松症的临床与实验研究进展[J].中日友好医院学报,1997,11(4):349-351
Zhang Shao-hua, ZHANG Yong-mei. Clinical and experimental research progress of osteoporosis treated by TCM [J]. Journal of China-Japan Friendship Hospital, 1997,11(4):349-351

(上接第 2250 页)

- [14] Waris G, Siddiqui A. Regulatory mechanisms of viral hepatitis B and C[J]. J Biosci, 2003,28:311-321
- [15] Zhang X, Zhang H, Ye L. Effects of hepatitis B virus X protein on the development of liver cancer[J]. J Lab Clin Med, 2006,147:58-66
- [16] 关剑,陈孝平,朱虹,等.乙型肝炎病毒 X 蛋白上调肝癌多药耐药相关基因表达的研究[J].肝胆外科杂志,2004,12:214-216
Guan Jian, Michael, Zhu Hong, etc. Of hepatitis b virus X protein raised more than drug resistance related liver cancer gene expression study [J]. J of Stet, 2004,12:214-216
- [17] Um HR, Lim WC, Chae SY, et al. Raf-1 and protein kinase B

regulate cell survival through the activation of NF-kappaB in hepatitis B virus X-expressing cells[J]. Virus Res, 2007,125:1-8

- [18] Malaguamera L, Pilastro MR, Vicari L, et al. Pyrrolidinedithiocarbamate induces apoptosis in human acute myelogenous leukemic cells affecting NF-kappaB activity[J]. Cancer Invest, 2005,23:404-412
- [19] 游建,王平,陈孝平.乙肝病毒 X 蛋白对肝癌细胞多药耐药的影响[J].中华实验外科杂志,2007,24:1328-1331
You Jian, Wang Ping, Michael. hepatitis b virus X protein on hepatoma cells more medicine resistance effects [J]. The experiment surgical magazine, 2007,24:1328-1331