

NLS-RAR α 蛋白在重组腺病毒Ad-NE感染的NB4中定位的验证

王 慧^{1,2} 钟 梁² 蒋开玲² 朱新瑜² 马鹏鹏² 阳小群² 刘北忠^{1,2*}

¹重庆医科大学附属永川医院中心实验室, 重庆 402160;

²重庆医科大学临床检验诊断学教育部重点实验室, 重庆 400016)

摘要 该实验主要验证重组腺病毒Ad-NE感染NB4细胞后, NLS-RAR α 蛋白的表达及其定位。用重组腺病毒Ad-NE感染NB4细胞, 检测感染效率, 分别用RT-PCR和Western blot法在mRNA水平和蛋白水平验证转染成功; 提取转染成功的NB4细胞的核蛋白, Western blot法检测细胞核中NLS-RAR α 蛋白的表达; FITC-Annexin V/DAPI双染色免疫荧光法检测转染成功的NB4细胞中NLS-RAR α 的表达及定位; FITC-Annexin V/PI双染色激光共聚焦法检测转染成功的NB4细胞中NLS-RAR α 的表达及定位。结果显示, 重组腺病毒Ad-NE和阴性对照腺病毒Ad-KZ对NB4细胞的感染效率可达70%~80%。RT-PCR和Western blot结果显示, 感染了重组腺病毒Ad-NLS-RAR α 的NB4细胞成功表达NE基因和NE蛋白, 且有NLS-RAR α 的蛋白表达。用细胞免疫荧光法、激光共聚焦法检测出已感染的NB4细胞中NLS-RAR α 蛋白的表达, 并推测其主要定位于胞核。综上所述, 该文成功用重组腺病毒Ad-NE感染NB4细胞, 并用Western blot法、免疫荧光法、激光共聚焦法验证了NLS-RAR α 蛋白的存在并推测其定位, 为进一步研究急性早幼粒细胞白血病的早期诊断及复发监测提供了新的思路。

关键词 NLS-RAR α ; 腺病毒; NB4; 急性早幼粒细胞白血病

Location Verification of NLS-RAR α Protein in Infected NB4 Cell Line with Adenovirus Ad-NE

Wang Hui^{1,2}, Zhong Liang², Jiang Kailing², Zhu Xinyu², Ma Pengpeng², Yang Xiaoqun², Liu Beizhong^{1,2*}

¹Central Laboratory of Yongchuan Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing 402160, China; ²Key Laboratory of Medical Diagnostics, Ministry of Education, Department of Laboratory Medicine, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract The experiment mainly investigated the presence and location of NLS-RAR α protein in NB4 cells infected with recombinant adenovirus Ad-NE. In our study, recombinant adenovirus Ad-NE was used to infect NB4 cells and then using FACS to confirm the efficiency of infection; RT-PCR and Western blot were used to identify the infection success in mRNA and protein levels; We extracted the nucleoprotein from successfully infected NB4 cells, and determined the expression of NLS-RAR α in NB4 cell nucleus by Western blot; FITC-Annexin V/DAPI double staining immunofluorescence and confocal laser scanning method were used to examine NLS-RAR α protein expression and localization in infected NB4 cells. The result showed that the infection efficiency of recom-

收稿日期: 2013-10-24 接受日期: 2013-12-02

国家自然科学基金(批准号: 81171658)和重庆市自然科学基金计划重点项目(批准号: 2011BA5037)资助的课题

*通讯作者。Tel: 023-68485006, E-mail: lbz2753@qq.com

Received: October 24, 2013 Accepted: December 2, 2013

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.81171658) and the Natural Science Foundation Project of CQ CSTC (Grant No.2011BA5037)

*Corresponding author. Tel: +86-23-68485006, E-mail: lbz2753@qq.com

网络出版时间: 2014-03-03 12:25 URL: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.11844/cjcb.2014.03.0340.html>

binant adenovirus Ad-NE and negative control adenovirus Ad-KZ in NB4 cells were up to 70%~80%. The results of RT-PCR and Western blot showed that NE gene and protein were successfully expressed in NB4 cells infected with recombinant adenovirus Ad-NE, and there did exist NLS-RAR α expression. Using cell immunofluorescence and confocal laser scanning, we found that NLS-RAR α protein was present in infected NB4 cells and mostly localized in cell nucleus. In summary, we have successfully infected NB4 cells with recombinant adenovirus Ad-NE and verified the existence of NLS-RAR α protein with Western blot, immunofluorescence and confocal laser scanning methods. NLS-RAR α was mainly localized in nucleus. These results provided a new way for further study in early diagnosis and monitoring of acute promyelocytic myeloid leukemia.

Key words NLS-RAR α ; adenovirus; NB4; acute promyelocytic leukemia

急性早幼粒细胞白血病 (acute promyelocytic leukemia, APL) 是急性髓细胞白血病的一个特殊类型, 发病迅速, 致死率高, 在 FAB 分型系统中被定义为 M3 型^[1]。临床研究发现, 约 97% 的 APL 发生特征性的 t(15;17)(15q22;17q21) 染色体易位, 形成早幼粒细胞白血病-维甲酸受体 α 融合基因 (*PML-RAR α*)^[2]。根据 *PML* 基因的断裂位点不同, *PML-RAR α* 融合基因可分为 3 种, 分别为 L 型、V 型、S 型, 在 *PML-RAR α* 融合基因中所占比例分别为 50%、5%、45%^[3]。本文研究的是 L 型。该融合基因翻译产生的异常转录抑制因子 *PML-RAR α* 是 APL 发病的分子基础, 通过抑制髓系分化相关基因的转录, 使粒细胞的分化异常地阻滞于早幼粒细胞阶段, 进而异常早幼粒细胞在骨髓中累积, 导致 APL 的发生^[4]。但 *PML-RAR α* 融合蛋白并非始终以整体的形式发挥作用。Lane 等^[5]发现, 中性白细胞弹性蛋白酶 (neutrophil elastase, NE) 可将 *PML-RAR α* 融合蛋白切割成 52 kDa 的缺失核定位信号的早幼粒白血病蛋白 *PML(NLS-)* 和 61 kDa 的带核定位信号的维甲酸受体 α (*NLS-RAR α*) 两种变异蛋白。Lane 等^[6]的后继研究也表明, NE 酶的这种切割作用对白血病的发生发展有重要作用。

在 APL 病人的疾病发展早期有 NE 的作用, 但现有的 APL 代表细胞株 NB4 中不含有 NE 酶^[6], 因此, 我们希望通过将 NE 酶转入 NB4 细胞来模拟这种变化。在本课题的前期研究中, 我们成功构建了重组腺病毒 Ad-NE, 希望通过将其感染 NB4 细胞模拟这种切割作用, 并通过 Western blot 法、免疫荧光法、激光共聚焦法对切割产物 NLS-RAR α 蛋白进行验证和定位, 从而为 APL 的早期诊断及复发监测提供新的思路, 为以后运用于临床奠定基础。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 细胞来源 NB4 细胞株和 K562 细胞株均由重庆医科大学临床检验诊断学实验室保存。重组腺病毒 pAdEasy-NE 和阴性对照腺病毒 AD-KZ 由本课题组保存。

1.1.2 主要试剂 培养 NB4 细胞的 RPMI 1640 培养基、胎牛血清 (FBS) 购自美国 GIBCO 公司; 培养 K562 细胞的 RPMI 1640 培养基、胎牛血清 (FBS) 购自美国 Hyclone 公司; 高保真 Taq DNA 多聚酶、PCR mixture、总 RNA 提取试剂盒、逆转录试剂盒购自日本 TaKaRa 公司; 琼脂糖购自美国 Invitrogen 公司; 细胞浆核蛋白提取试剂盒、RIPA 细胞裂解液、核染料 DAPI、核染料 PI 购自碧云天生物技术研究所; 兔抗人 NE 多克隆抗体、兔抗人 RAR α 多克隆抗体购自美国 Santa Cruz 公司; 兔抗人 Histone H3 多克隆抗体购自 Bioworld 公司; 鼠抗人 β -actin 单克隆抗体、HRP 标记的羊抗兔和羊抗鼠的 IgG、异硫氰酸荧光素 (FITC) 标记的羊抗兔 IgG 均购自北京中山金桥生物技术有限公司。

1.2 方 法

1.2.1 细胞培养 NB4 细胞和 K562 细胞分别选用含 20% 优质胎牛血清和含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养基, 于 37 °C、5% CO₂ 的饱和湿度孵箱内常规培养, 每 1~2 d 换液传代, 选择对数生长期的细胞用于后续实验。

1.2.2 重组腺病毒感染 NB4 细胞感染效率检测 用重组腺病毒 pAdEasy-NE 和阴性对照腺病毒 AD-KZ 感染 NB4 细胞, 48 h 后收集细胞, 流式细胞仪检测感染效率。

1.2.3 RT-PCR 检测感染细胞中 NE mRNA 的表达 取对数生长期的 NB4 细胞分别感染重组腺病毒

pAdEasy-NE及阴性对照腺病毒Ad-KZ, 48 h后提取细胞总RNA, 取2 μ L测浓度。分别取RNA各500 ng逆转录成cDNA。分别取1.5 μ L cDNA产物进行PCR。通过查询NCBI, 找到NE基因的CDS序列, 设计引物如下: 上游引物序列为: 5'-TAC AAG CTT ATG ACC CTC GGC CGC CGA-3', 下游引物序列: 5'-ATC GAT ATC TCA GTG GGT CCT GCT GGC-3', 扩增片段长度为803 bp。PCR反应条件为: 94 $^{\circ}$ C预变性5 min; 94 $^{\circ}$ C变性30 s, 58 $^{\circ}$ C退火30 s, 72 $^{\circ}$ C延伸50 s, 共34个循环; 72 $^{\circ}$ C再延伸5 min。取PCR产物各10 μ L经1.0%琼脂糖凝胶电泳检测。以未感染病毒的细胞为对照。

1.2.4 Western blot法检测NE蛋白的表达 取对数生长期的NB4细胞分别感染重组腺病毒pAdEasy-NE及阴性对照腺病毒Ad-KZ, 48 h后, RIPA裂解提取细胞总蛋白, 用BCA法定量, 分别取100 μ g蛋白进行SDS-PAGE电泳, 以半干转膜法转至PVDF膜上, 用含5%脱脂奶粉的TBST封闭4 h后, 加入兔抗人NE多抗(5%脱脂奶粉1:500稀释), 4 $^{\circ}$ C孵育8 h。洗膜: 用TBST洗2次, 每次10 min, 再用TBS洗10 min。加入羊抗兔IgG(5%脱脂奶粉1:1 000稀释), 37 $^{\circ}$ C孵育1 h, 然后洗膜(步骤同上)。于暗室化学发光显影成像, 以 β -actin作为内参。

1.2.5 Western blot法验证NLS-RAR α 蛋白存在 取对数生长期的NB4细胞分别感染重组腺病毒pAdEasy-NE及阴性对照腺病毒Ad-KZ, 48 h后收集细胞, 按说明书分别提取胞核蛋白; 用BCA法定量, 取100 μ g蛋白进行SDS-PAGE电泳, 以半干转膜法转至PVDF膜上, 用含5%脱脂奶粉的TBST封闭4 h后, 加入兔抗人RAR α 多抗(5%脱脂奶粉1:500稀释), 4 $^{\circ}$ C孵育8 h。洗膜: 用TBST洗2次, 每次10 min, 再用TBS洗10 min。加入羊抗兔IgG(5%脱脂奶粉1:500稀释), 37 $^{\circ}$ C孵育1 h, 然后洗膜(步骤同上), 最后进行化学发光显色和成像分析。以Histone H3作为核内参。设置未感染NB4细胞和未感染K562两个对照组。

1.2.6 免疫荧光法检测NLS-RAR α 蛋白的表达及定位 取对数生长期的NB4细胞感染重组腺病毒pAdEasy-NE及阴性对照腺病毒Ad-KZ, 48 h后收集细胞, 用PBS洗三次, 各取10 μ L涂片; 用4%的多聚甲醛固定20 min后, PBS漂洗三次; 再用0.1% Triton透膜处理10 min。10%山羊血清室温封闭30 min, 加上兔抗人RAR α 抗体(封闭血清1:200), 4 $^{\circ}$ C过夜。PBS洗3次, 加FITC-Annexin V标记的荧光二抗(封闭血

清1:200), 37 $^{\circ}$ C孵育1 h。PBS洗3次, 加入核染色液DAPI 5 min, PBS漂洗3次, 用70%甘油封固, 荧光显微镜下观察拍照。设置未感染NB4细胞和未感染的K562两个对照组。

1.2.7 激光共聚焦显微镜法检测NLS-RAR α 蛋白的表达及定位 将核染液由DAPI换成PI, 制片方法与1.2.6免疫荧光相同。以红绿双色荧光通道扫描观察。绿光的激发波长为488 nm, 在600 nm波长以上观察。红光的激发波长为540 nm, 在600 nm波长以上观察。每张切片选取荧光表达最强的10个视野观察, 并由计算机扫描软件LAS AF lite进行扫描分析。设置未感染NB4细胞和未感染K562两个对照组。

1.2.8 数据统计 所有实验独立重复3次, RT-PCR及Western blot结果均用Quantity One进行灰度分析, 用目的基因吸光度值/内参吸光度值的均数 \pm 标准差表示, 统计软件为SPSS 17.0, 采用student's *t*检验及方差分析进行统计学分析, $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 感染效率检测

感染病毒48 h后, 经流式细胞术检测显示, 感染效率达到70%~80%(图1)。

2.2 RT-PCR检测感染细胞中NE基因mRNA水平的表达

Ad-NE感染组特异性条带位于约803 bp处, 大小符合预期; 而Ad-KZ空载组和未感染组在相同位置未出现条带($P < 0.05$)。说明Ad-NE感染组中NE基因成功表达其mRNA(图2)。

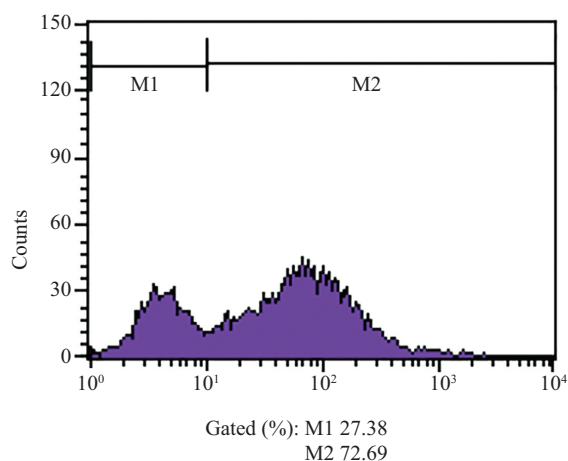


图1 流式细胞仪测感染效率

Fig.1 Infection efficiency measured by flow cytometry

2.3 Western blot检测感染细胞中的NE酶的表达

如图3所示, Ad-NE感染组在29 kDa附近出现了与NE蛋白分子量大小相近的特异性条带, 而Ad-KZ空载组和未感染组均未出现($P<0.05$), 说明Ad-NE感染组中NE蛋白成功表达。

2.4 Western blot检测感染细胞中的NLS-RAR α 蛋白的表达

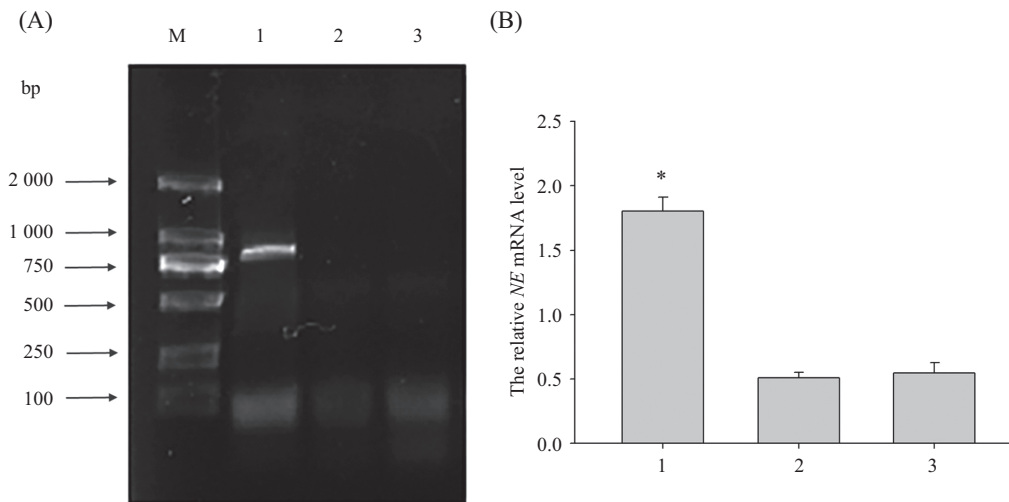
Ad-NE感染组在蛋白分子量约61 kDa处出现了与NLS-RAR α 蛋白分子量大小相近的特异性条带, 而Ad-KZ空载组、未感染组和K562组均未出现($P<0.05$)。推测可以通过Western blot检测Ad-NE感染组细胞核中NLS-RAR α 蛋白的表达情况。以Histone H3作为核内参, 其蛋白分子量约20 kDa(图4)。

2.5 免疫荧光法检测NLS-RAR α 蛋白的表达及定位

Ad-NE组中FITC染色区域与胞核DAPI染色几乎重叠, 说明NLS-RAR α 蛋白在Ad-NE组中主要在胞核内表达, 而Ad-KZ空载组、未感染组和K562组中FITC染色区域明显大于胞核DAPI染色区域, 且胞核区域染色较浅, 推测NB4和K562中有野生型RAR α 蛋白的存在, 且主要分布于胞浆内(图5)。

2.6 激光共聚焦显微镜观察法检测NLS-RAR α 蛋白的表达及定位

Ad-NE组中FITC染色区域与胞核PI染色几乎重叠, 说明NLS-RAR α 蛋白在Ad-NE组中主要在胞核内表达, 而Ad-KZ空载组、未感染组和K562组中FITC

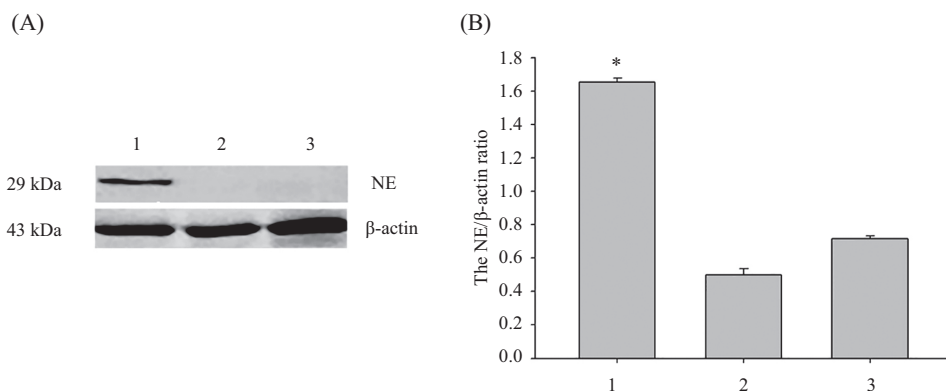


A: 不同组NE基因的表达; B: A的量化图。M: marker; 1: Ad-NE组; 2: Ad-KZ组; 3: 未感染组。* $P<0.05$, 与对照组比较。

A: the expression of NE mRNA in different groups; B: statistical analysis of A. M: marker; 1: Ad-NE group; 2: Ad-KZ group; 3: uninfected group. * $P<0.05$ vs control groups.

图2 RT-PCR产物凝胶电泳图

Fig.2 Gel electrophoresis result of RT-PCR products

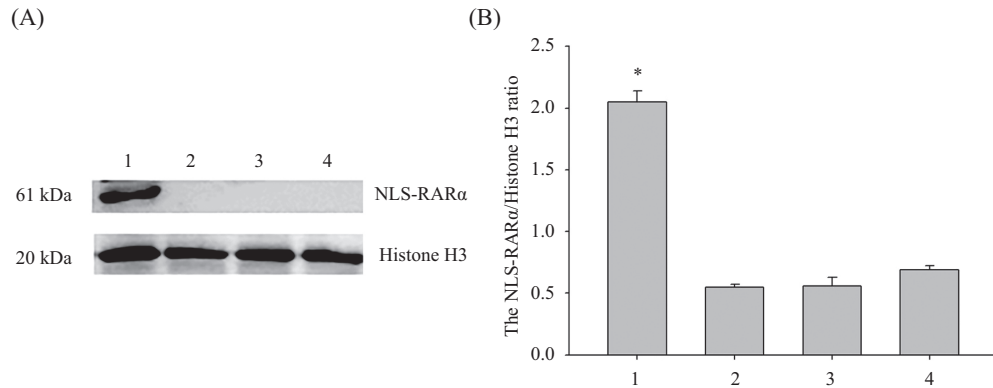


A: 不同组细胞中NE酶的表达变化; B: A的量化图。1: Ad-NE组; 2: Ad-KZ组; 3: 未感染组。* $P<0.05$, 与对照组比较。

A: the expression of enzyme NE in different groups; B: statistical analysis of A. 1: Ad-NE group; 2: Ad-KZ group; 3: uninfected group. * $P<0.05$ vs control groups.

图3 Western blot验证感染细胞中NE酶的表达

Fig.3 Western blot analysis of the enzyme NE expression in infected cells

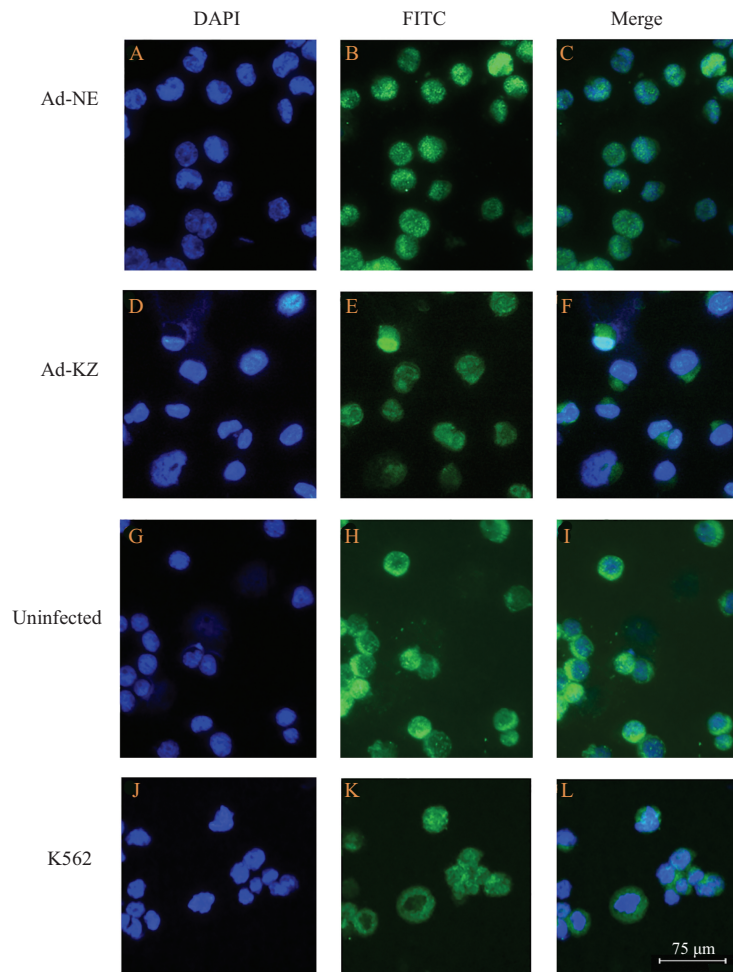


A: 不同组细胞中NLS-RAR α 蛋白的表达变化; B: A的量化图。1: Ad-NE组; 2: Ad-KZ组; 3: 未感染组; 4: K562组。* $P < 0.05$, 与其他组比较。

A: the expression of NLS-RAR α in different groups; B: statistical analysis of A. 1: Ad-NE group; 2: Ad-KZ group; 3: uninfected group; 4: K562 group. * $P < 0.05$ vs other groups.

图4 Western blot检测感染细胞中NLS-RAR α 蛋白的表达

Fig.4 Western blot analysis of NLS-RAR α protein expression in infected cells

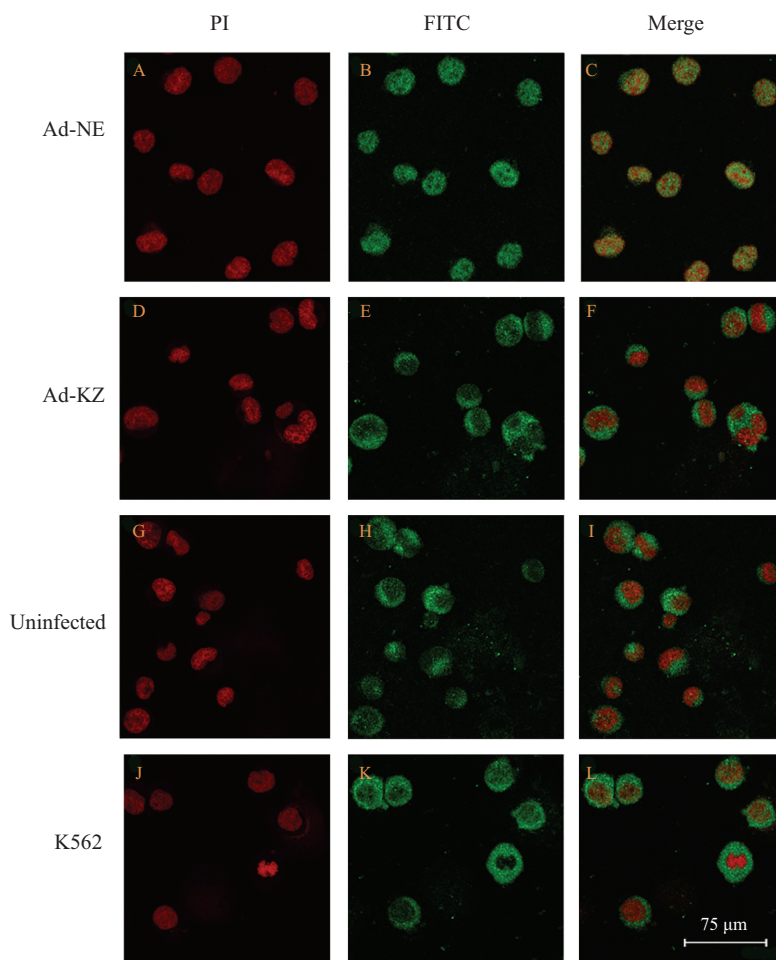


A: Ad-NE组DAPI染色的胞核; B: Ad-NE组FITC染色区域; C: A与B融合图; D: Ad-KZ空载组DAPI染色的胞核; E: Ad-KZ空载组FITC染色区域; F: D与E融合图; G: 未感染组DAPI染色的胞核; H: 未感染组FITC染色区域; I: G与H融合图; J: K562组DAPI染色的胞核; K: K562组FITC染色区域; L: J与K融合图。

A: Ad-NE group stained by DAPI; B: Ad-NE group stained by FITC-Annexin V; C: merge of A and B; D: Ad-KZ group stained by DAPI; E: Ad-KZ group stained by FITC-Annexin V; F: merge of D and E; G: uninfected group stained by DAPI; H: uninfected group stained by FITC-Annexin V; I: merge of G and H; J: K562 group stained by DAPI; K: K562 group stained by FITC-Annexin V; L: merge of J and K.

图5 细胞免疫荧光图

Fig.5 The results of immunofluorescence



A: Ad-NE组PI染色的胞核; B: Ad-NE组FITC染色区域; C: A与B融合图; D: Ad-KZ空载组PI染色的胞核; E: Ad-KZ空载组FITC染色区域; F: D与E融合图; G: 未感染组PI染色的胞核; H: 未感染组FITC染色区域; I: G与H融合图; J: K562组PI染色的胞核; K: K562组FITC染色区域; L: J与K融合图。

A: Ad-NE group stained by PI; B: Ad-NE group stained by FITC-Annexin V; C: merge of A and B; D: Ad-KZ group stained by PI; E: Ad-KZ group stained by FITC-Annexin V; F: merge of D and E; G: uninfected group stained by PI; H: uninfected group stained by FITC-Annexin V; I: merge of G and H; J: K562 group stained by PI; K: K562 group stained by FITC-Annexin V; L: merge of J and K.

图6 激光共聚焦图

Fig.6 The results of laser confocal microscope

染色区域明显大于胞核PI染色区域,且胞核区域染色较浅,推测在NB4和K562细胞中,野生型RAR α 蛋白在胞浆胞核皆有表达,且主要在胞浆(图6)。

3 讨论

急性早幼粒细胞白血病,是一类造血干细胞的恶性克隆性疾病。虽为急性白血病当中治愈率最高的一个类型,但其发病迅速,早期致死率高,有10%~20%的患者死于早期出血,因此对APL的早期诊断和早期复发监测显得尤为重要。本课题组前期实验证明了NLS-RAR α 蛋白与JTV1蛋白、Ubiquitin1蛋白、谷氨酰胺连接酶等均有相互作用^[7-9],且PML(NLS-)具有促生长和诱导凋亡的作用^[10]。而

NLS信号区域对NLS-RAR α 蛋白质定位有重要作用。我们发现与野生型相比,原先主要在胞核的PML蛋白在融合蛋白异常切割后,PML(NLS-)大部分转移至胞浆,而原本主要在胞浆表达的RAR α 蛋白(51 kDa)在切割后,成为NLS-RAR α 蛋白(61 kDa)而迁至胞核。我们以这一系列的变化为线索,展开NLS-RAR α 蛋白的作用机制和检测方法等相关研究,力求实用于临床。

尽管近年来对APL的诊断和治疗的研究逐渐深入,APL的常规临床诊断方法包括染色体分析、Southern blot、FISH等技术^[11],且用荧光原位杂交克服了探测中期细胞的变异、缺失和神秘亚结构重排等困难^[12],但对APL的确诊仍然停留在骨髓细胞形态

学和细胞遗传学检测上,方法较为单一,且步骤繁琐,花费昂贵。最新研究结果中提到的检测方法,包括新型高速液滴逆转录-聚合酶链反应^[13]、流式细胞仪免疫珠分析^[1]、RT-PCR^[14]等,都是遗传学中用来检测融合基因和融合蛋白的深入,对其他检测指标的探索较少。因此,研究开发一种简便、快速、准确、灵敏、经济的APL基因诊断技术具有广阔的应用前景。

NB4细胞株具有典型的t(15;17)(15q22;17q21)染色体易位及PML-RAR α 融合基因特征,是被广泛用于APL研究的细胞模型。而K562属人慢性髓原白血病细胞株,没有PML-RAR α 融合基因特征,可以作为对照组细胞。本课题希望通过对NLS-RAR α 蛋白在APL代表细胞株NB4中的定位研究,为APL早期诊断和复发检测新的指标提供思路。故本文在前期实验的基础上,用重组腺病毒Ad-NE感染NB4,并证明NE酶成功表达,证明该细胞作为APL早期有NE切割作用的疾病模型的可行性,再通过Western blot法、细胞免疫荧光法、激光共聚焦显微镜验证NLS-RAR α 蛋白的表达及定位。实验结果显示,感染了重组腺病毒Ad-NE的NB4细胞成功表达NE基因和NE蛋白,进而用Western blot法、细胞免疫荧光法、激光共聚焦法检测出已感染的NB4细胞中NLS-RAR α 蛋白的表达并推测其主要分布于胞核。当然,这3种方法的方法学评价和其他新的检测方法有待进一步实验论证和探索,临床标本中的论证也会在接下来的工作中展开。

综上所述,本研究成功用重组腺病毒Ad-NE感染NB4细胞,并用Western blot法、免疫荧光法、激光共聚焦法验证其中NLS-RAR α 蛋白的存在及其定位,为APL的早期诊断和复发监测提供了新思路,为进一步研究APL的临床诊断和治疗奠定基础。

参考文献 (References)

- Gallagher RE, Li YP, Rao S, Paietta E, Andersen J, Etkind P, *et al.* Characterization of acute promyelocytic identification of a subgroup with decreased *in vitro* responsiveness to all -trans retinoic acid. *Blood* 1995; 86(4): 1540-7.
- Dekking EH, van der Velden VH, Varro R, Wai H, Böttcher S, Kneba M, *et al.* Flow cytometric immunobead assay for fast and easy detection of PML-RARA fusion proteins for the diagnosis of acute promyelocytic leukemia. *Leukemia* 2012; 26(9): 1976-85.
- González M, Barragán E, Bolufer P, Chillón C, Colomer D, Borstein R, *et al.* Pretreatment characteristics and clinical outcome of acute promyelocytic leukemia patients according to the PML/RAR α isoforms: A study of the PETHE-MA group. *Br J Haematol* 2001; 114(1): 99-103.
- 仇 飞, 张 辉, 赵旭杰, 朱雪花, 王侃侃, 张 济. 免疫荧光动态监测急性早幼粒细胞白血病PML-RAR α 融合蛋白变化. 中国组织工程研究(Qiu Fei, Zhang Hui, Zhao Xujie, Zhu Xuehua, Wang Kankan, Zhang Ji. Immunofluorescence for dynamic monitoring of PML-RAR α fusion protein in patients with acute promyelocytic leukemia. *Chinese Journal of Tissue Engineering Research*) 2012; 16(10): 1875-8.
- Lane AA, Ley TJ. Neutrophil elastase cleaves PML-RAR α and is important for the development of acute promyelocytic leukemia in mice. *Cell* 2003; 115(3): 305-18.
- Lane AA, Ley TJ. Neutrophil elastase is important for PML-retinoic acid receptor α activities in early myeloid cells. *Mol Cell Biol* 2005; 25(1): 23-33.
- Wang C, Wang DS, Liu BZ, Hao P, Liu C, Jin DT, *et al.* Identification of the interactions between JTV1 and NLS-RAR α *in vivo* and *in vitro*. *Sichuan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban* 2009; 40(3): 382-4.
- 朱 丹, 王 翀, 刘北忠, 吴 燕, 钟 梁, 王春光, 等. 带核定位信号的维甲酸受体 α 与Ubiquilin 1蛋白相互作用的验证. 中南大学学报(医学版)(Zhu Dan, Wang Chong, Liu Beizhong, Wu Yan, Zhong Liang, Wang Chunguang, *et al.* Interaction between nuclear localization signal-retinoic acid receptor α and Ubiquilin 1. *Journal of Central South University (Medical Sciences)* 2010; 35(7): 649-54.
- 吴 燕, 刘北忠, 王 翀, 钟 梁, 朱 丹, 王春光, 等. 带核定位信号的RAR α 与谷氨酸氨连接酶蛋白相互作用的胞内外验证. 第二军医大学学报(Wu Yan, Liu Beizhong, Wang Chong, Zhong Liang, Zhu Dan, Wang Chunguang, *et al.* Verification of interaction between glutamate-ammonia ligase and nuclear localization signal-retinoic acid receptor α protein inside and outside cells. *Academic Journal of Second Military Medical University*) 2010; 31(5): 468-71.
- Gao YM, Zhong L, Zhang X, Hu XX, Liu BZ. PML (NLS (-)) inhibits cell apoptosis and promotes proliferation in HL-60 cells. *Int J Med Sci* 2013; 10(5): 498-507.
- 汪红梅, 翁少煌, 林丽清, 林新华, 陈元仲. 计时电量法用于检测急性早幼粒细胞白血病PML/RAR α 融合基因的研究. 分析测试学报(Wang Hongmei, Weng Shaohuang, Lin Liqing, Lin Xinhua, Chen Yuanzhong. Study on the detection of PML/RAR α fusion gene in acute promyelocytic leukemia based on chronocoulometric method. *Journal of Instrumental Analysis*) 2011; 30(8): 872-6.
- Amare PK, Baisane C, Nair R, Menon H, Banavali S, Kabre S, *et al.* Characterization of cryptic rearrangements, deletion, complex variants of PML, RARA in acute promyelocytic leukemia. *Indian J Hum Genet* 2011; 17(2): 54-8.
- Sueki A, Matsuda K, Taira C, Yamaguchi A, Koeda H, Takagi F, *et al.* Rapid detection of PML-RARA fusion gene by novel high-speed droplet-reverse transcriptase-polymerase chain reaction: Possibility for molecular diagnosis without lagging behind the morphological analyses. *Clin Chim Acta* 2013; 415: 276-8.
- Zhang L, Cao Z, Zou Y, Ruan M, Li Q, Wang J, *et al.* Quantification of PML/RAR α transcript after induction predicts outcome in children with acute promyelocytic leukemia. *Int J Hematol* 2012; 95(5): 500-8.