

# FKBP-RAP-FRB系统转运BCR-ABL入核对 K562细胞的增殖抑制效应

高淼 黄峥兰 曹唯希 李千音 李会 冯文莉\*

(重庆医科大学临床血液学教研室, 教育部临床检验诊断学重点实验室, 重庆 400016)

**摘要** BCR-ABL融合蛋白是慢性粒细胞白血病(chronic myeloid leukemia, CML)发病的基础。其中, BCR-ABL只能定位于细胞浆、不能易位至细胞核是其致病的关键因素。因此, 转运BCR-ABL入核可能是治疗CML的潜在方法。该研究利用基因重组技术, 构建HA-2FKBP-ABD(HF2A)和FLAG-3NLS-FRB\*(FN3R)重组腺病毒, 与雷帕霉素类似物(Rapamycin analog)一同组成FKBP-RAP-FRB系统, 转运K562细胞胞浆中的BCR-ABL癌蛋白至细胞核, 并探究其对K562细胞增殖的影响。结果显示, 成功构建了高滴度的重组腺病毒, Western blot证实目的蛋白在K562细胞内成功表达。FKBP-RAP-FRB系统可通过转运BCR-ABL入核, 抑制K562细胞生长和克隆形成的能力。结果揭示, FKBP-RAP-FRB系统转运BCR-ABL入核有望为CML提供新的治疗手段。

**关键词** 慢性粒细胞白血病; BCR-ABL; K562细胞; 重组腺病毒

## Inhibitory Effect on Proliferation of K562 Cells by Transporting BCR-ABL into Nucleus with FKBP-RAP-FRB System

Gao Miao, Huang Zhenglan, Cao Weixi, Li Qianyin, Li Hui, Feng Wenli\*

(Department of Clinical Hematology, Key Laboratory of Medical Diagnostics, Ministry of Education,  
Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

**Abstract** BCR-ABL fusion protein is demonstrated as the pathogenesis of chronic myeloid leukemia (CML). Failure of cytoplasmic BCR-ABL translocating into nucleus plays a key role. Therefore, transporting BCR-ABL into nucleus may be a potential therapeutic approach of CML. In this study, HA-2FKBP-ABD (HF2A) and FLAG-3NLS-FRB\* (FN3R) recombinant adenovirus were constructed by recombinant DNA technology. HF2A, FN3R, and rapamycin analog constituted FKBP-RAP-FRB system, which was used to transport cytoplasmic BCR-ABL oncoprotein into nucleus. By this mean, the effect on the proliferation of K562 cells was detected. Our results showed that high titer of recombinant adenovirus were successfully constructed, and the target protein was successfully expressed in K562 cells confirmed by Western blot. FKBP-RAP-FRB system could inhibit growth and colony formation of K562 cells by transporting BCR-ABL into nucleus. These results revealed that FKBP-RAP-FRB system transporting BCR-ABL into nucleus could provide new insights for the treatment of CML.

**Key words** chronic myeloid leukemia; BCR-ABL; K562 cells; recombinant adenovirus

收稿日期: 2013-09-02 接受日期: 2014-01-06

国家自然科学基金(批准号: 81070421)资助的课题

\*通讯作者。Tel: 023-68485240, E-mail: fengwlcqmu@sina.com

Received: September 2, 2013 Accepted: January 6, 2014

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.81070421)

\*Corresponding author. Tel: +86-23-68485240, E-mail: fengwlcqmu@sina.com

网络出版时间: 2014-03-25 17:10

URL: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.11844/cjcb.2014.04.0280.html>

正常的*c-Abl*基因在胞浆、胞核均可定位, *c-Abl*入核对于调节细胞正常的增殖信号非常重要<sup>[1]</sup>。而*bcr-abl*融合基因只能定位于细胞浆, 通过激活*PI3K*、*STAT5*等, 导致细胞恶性增殖, 成为重要的致白血病信号<sup>[2]</sup>。FKBP-RAP-FRB系统在选择性诱导蛋白的相互作用、改变蛋白的亚细胞定位方面应用广泛。FKBP12(简称FKBP)是雷帕霉素(Rapamycin, RAP)在细胞内的结合靶点。FRB, 是FKBP-RAP结合结构域(FKBP-rapamycin binding domain), 在调节细胞生长中起着重要的作用<sup>[3]</sup>。用RAP类似物AP21967代替RAP, 同时对FRB进行突变修饰(简称FRB\*), 使RAP类似物只结合FRB\*, 而不结合细胞内的FRB<sup>[4]</sup>。

本课题拟将3段核定位信号(nuclear localization signal, NLS)与FRB\*融合, 将能够高特异性、高亲和力结合BCR-ABL的Rin1蛋白的ABD(Abl binding domain, ABD)结构域<sup>[5]</sup>与FKBP融合, 构建HA-2FKBP-ABD(HF2A)和FLAG-3NLS-FRB\*(FN3R)重组腺病毒, 将两者共感染K562细胞, 在AP21967的诱导下, 将BCR-ABL转运入核, 达到抑制K562细胞增殖的目的。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 质粒、菌株和细胞株 pHF2质粒<sup>[6]</sup>、FN3R腺病毒和空载腺病毒<sup>[7]</sup>为本课题前期所构建, MIGR1-ABD质粒和MIGR1-ABD<sup>TM</sup>质粒<sup>[8]</sup>将ABD结合BCR-ABL的36位、121位和148位三个关键酪氨酸突变为苯丙氨酸(Y36F、Y121F、Y148F), 不能结合BCR-ABL由美国J. Colicelli教授馈赠。pAd5F35腺病毒骨架质粒、*E. coli* DH5 $\alpha$ 、BJ5183、AD-293细胞和K562细胞均为本实验室保存。

1.1.2 试剂及仪器 RNA提取试剂盒、PrimeScript RT reagent Kit、PrimeSTAR<sup>®</sup> HS DNA聚合酶、限制性内切酶(*Xho* I、*Xba* I)、T<sub>4</sub> DNA连接酶、DNA marker(DL2000、DL10000、DL15000)均购自TaKaRa公司; *Pme* I和*Pac* I内切酶(NEB公司); PCR产物纯化试剂盒和质粒提取试剂盒(天根生化科技有限公司); Lipofectamine<sup>™</sup> 2000和Opti-MEM I(Invitrogen公司); 鼠抗HA单抗、兔抗*c-Abl*单抗、兔抗H2A·X单抗和RIPA细胞裂解液(Cell Signaling Technology公司); 胞浆和胞核蛋白提取试剂盒(南京凯基生物科技发展有限公司); 鼠抗FLAG单抗和基因转染增强剂

Polybrene(Sigma公司); 鼠抗 $\beta$ -actin单抗和HRP标记的山羊抗鼠或抗兔二抗(Santa Cruz公司); ECL化学发光试剂(Millipore公司); DMEM和RPMI-1640培养液(Gibco公司); 胎牛血清(杭州四季青生物工程材料有限公司); MTS(Promega公司); AP21967(Clontech公司)。ECP 3000 DNA电泳仪和DYY-10C型蛋白电泳仪(北京市六一仪器厂); Trans-Blot<sup>®</sup>半干电转转膜仪、Gel Doc 2000 DNA凝胶成像仪和T100<sup>™</sup>热循环仪(Bio-Rad公司); COOL IMAGER化学发光成像仪(Viagene公司); HERAEUS FRESCO 17高速冷冻离心机(Thermo Scientific公司); 倒置荧光显微镜(Nikon公司); 酶标仪(Tecan公司)。

### 1.2 方法

1.2.1 细胞培养 AD-293细胞和K562细胞分别用含10%胎牛血清的DMEM和RPMI-1640培养液行常规培养。

1.2.2 引物设计与合成 根据ABD序列(Gene Bank: NM\_004292.2), 用Primer Premier 5.0软件设计引物。上游引物: 5'-CCG CTC GAG ATG GAA AGC CCT GGA GAG TCA GGC GCG GGC-3', 下游引物: 5'-GCT CTA GAT TAG TAC CCC ACT GAG CTC TCC CTC CGT AGC-3', 下划线部分分别为*Xho* I、*Xba* I酶切位点, 扩增ABD<sup>TM</sup>的引物与ABD相同, 引物由北京华大基因公司合成。

1.2.3 目的基因的扩增 以MIGR1-ABD质粒为模板, PCR扩增ABD片段, 总体系为25  $\mu$ L, 包括5 $\times$ PS buffer 5  $\mu$ L, 2.5 mmol/L的dNTP 2  $\mu$ L, 2.5 U/ $\mu$ L的PrimeSTAR<sup>®</sup> HS DNA聚合酶0.25  $\mu$ L, 10  $\mu$ mol/L的上、下游引物各0.5  $\mu$ L, 模板20  $\mu$ g, 灭菌水补齐总体积。阴性对照组以灭菌水代替模板。循环参数: 98  $^{\circ}$ C 1 min; 98  $^{\circ}$ C 10 s, 55  $^{\circ}$ C 15 s, 72  $^{\circ}$ C 70 s, 共28个循环; 72  $^{\circ}$ C 5 min。ABD<sup>TM</sup>扩增条件与ABD相同。反应产物经15 g/L琼脂糖电泳鉴定无误后, 用PCR产物纯化试剂盒纯化, -20  $^{\circ}$ C保存。

1.2.4 穿梭载体的构建 *Xho* I、*Xba* I双酶切纯化后的ABD PCR产物和pHF2质粒, 再次纯化后用T<sub>4</sub> DNA连接酶于16  $^{\circ}$ C连接过夜。将连接产物全部转化DH5 $\alpha$ 感受态细菌, 25 mg/L卡那霉素平板筛选。挑取单菌落, 增菌提取质粒, 双酶切鉴定, 同时以未酶切的相应质粒作为阴性对照。酶切正确的质粒送北京华大基因公司测序, 鉴定无误后, 命名为pHF2A, pHF2A<sup>TM</sup>的构建条件与pHF2A相同。

1.2.5 腺病毒同源重组 *Pme* I线性化pHF2A穿梭质粒, 纯化后取100 ng转化含有pAd5F35腺病毒骨架质粒的BJ5183感受态细菌。重组质粒经*Pac* I酶切鉴定, 挑选酶切出4.5 Kb条带的质粒, 转化DH5 $\alpha$ 感受态细菌以扩增质粒, 再次经*Pac* I酶切鉴定正确后, 命名为pAd5F35-HF2A, 同时构建突变体pAd5F35-HF2A<sup>TM</sup>, -20 °C保存。

1.2.6 腺病毒的包装、扩增和滴度测定 *Pac* I酶切适量的pAd5F35-HF2A质粒, 乙醇沉淀法纯化后, 按Lipofectamine<sup>TM</sup> 2000操作说明转染AD-293细胞, 原代病毒经过3~4轮扩增, 获得高滴度的腺病毒。滴度测定采用基因转移单位法(gene transfer unit, GTU), 与本课题前期构建FN3R腺病毒时的操作相同<sup>[7]</sup>, 同时构建HF2A<sup>TM</sup>的重组腺病毒。

1.2.7 目的蛋白在K562细胞中的表达鉴定 接种 $1 \times 10^6$  K562细胞于35 cm<sup>2</sup>培养瓶中, 病毒量按MOI=10<sup>6</sup>加入, 同时加入终浓度为4 mg/L的基因转染增强剂polybrene, 48 h后收集细胞提蛋白, 上样200  $\mu$ g, 10% SDS-PAGE电泳分离, 用半干电转膜仪将目的蛋白转移至PVDF膜, 条件为0.1 A, 19 min。4 °C封闭4 h, 鼠抗HA单抗4 °C孵育过夜, 山羊抗鼠二抗室温孵育1 h, ECL化学发光。实验同时设立HF2A<sup>TM</sup>突变组及空载组, 条件与HF2A相同。 $\beta$ -actin作为上样量的校正。

1.2.8 Western blot分析FKBP-RAP-FRB系统对BCR-ABL定位的影响 实验分为实验组、突变组和空载组, 实验组按MOI=10<sup>6</sup>加入HF2A和FN3R腺病毒, 终浓度为4 mg/L的polybrene, 12 h后加入终浓度为2  $\mu$ mol/L的AP21967, 48 h后收集细胞, 按照试剂盒说明书提取胞浆、胞核蛋白, 上样200  $\mu$ g, 6%~12%梯度SDS-PAGE胶电泳分离, 用半干电转膜仪将BCR-ABL转移至PVDF膜, 条件为0.1 A, 60 min。4 °C封闭4 h, 兔抗c-Abl单抗4 °C孵育过夜, 山羊抗兔二抗室温孵育1 h, ECL化学发光。胞浆、胞核蛋白分别以 $\beta$ -actin和H2A·X作为上样量的校正。突变组以HF2A<sup>TM</sup>腺病毒代替HF2A腺病毒, 空载组以空载腺病毒代替HF2A和FN3R腺病毒, 其余处理相同。

1.2.9 FKBP-RAP-FRB系统对K562细胞生长的影响 取对数生长期的K562细胞以 $2 \times 10^3$ /孔加入96孔培养板中, 每孔100  $\mu$ L培养基。按上述分组和方法处理各组细胞, 每组设3个复孔, 培养1~5 d。每孔加入MTS试剂10  $\mu$ L, 37 °C避光孵育4 h, 在酶标仪490 nm

处测定吸光度值 $D$ 。以时间为横坐标, 吸光度值( $D$ )为纵坐标绘制细胞生长曲线。

1.2.10 FKBP-RAP-FRB系统对K562细胞克隆形成能力的影响 各组K562细胞按上述分组和方法处理48 h后离心收集细胞, 用含20%血清的培养基重悬细胞并计数。24孔板中每孔按1:1的比例加入1.8%的甲基纤维素和20%血清的培养基共1.5 mL, 充分混匀。每孔加入500个细胞, 混匀, 每组设3个复孔。放入含5% CO<sub>2</sub>、饱和湿度的孵箱于37 °C培养10~14 d, 观察细胞克隆的形成。

## 2 结果

### 2.1 PCR扩增获得ABD及其突变体ABD<sup>TM</sup>

PCR产物电泳显示, 片段大小与预期值888 bp相符(图1), 证明成功扩增获得目的基因ABD和ABD<sup>TM</sup>。

### 2.2 HF2A和HF2A<sup>TM</sup>穿梭质粒的构建

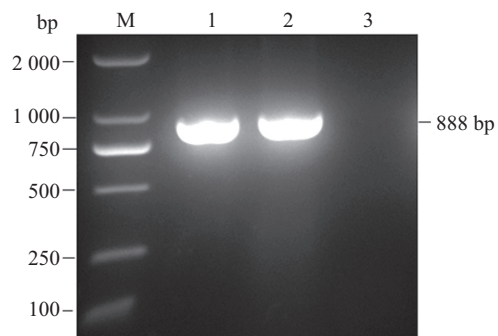
将ABD和ABD<sup>TM</sup>分别克隆入前期构建的pHF2穿梭质粒, *Xho* I、*Xba* I双酶切鉴定。电泳结果显示, 两种质粒均酶切出目的片段888 bp(图2)。测序结果与序列(Genebank: NM\_004292.2)完全吻合(结果未显示), 证实HF2A和HF2A<sup>TM</sup>穿梭质粒构建成功。

### 2.3 HF2A和HF2A<sup>TM</sup>腺病毒质粒的构建

HF2A和HF2A<sup>TM</sup>穿梭质粒与pAd5F35腺病毒骨架质粒重组后, *Pac* I酶切重组腺病毒质粒, 电泳显示, 酶切出4.5 Kb条带, 证实成功构建了HF2A和HF2A<sup>TM</sup>腺病毒质粒(图3)。

### 2.4 重组腺病毒的包装、扩增和滴度测定

包装的原代病毒于第13 d收获, 原代病毒经过

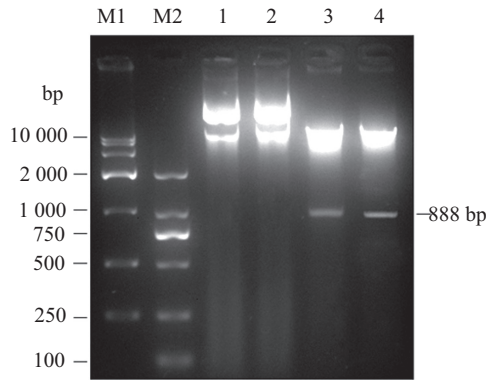


M: DNA marker DL2000; 1: ABD扩增产物; 2: ABD<sup>TM</sup>扩增产物; 3: 未添加模板的阴性对照。

M: DNA marker DL2000; 1: PCR product of ABD; 2: PCR product of ABD<sup>TM</sup>; 3: negative control.

图1 PCR扩增产物电泳图

Fig.1 Electrophoretic profile of PCR products

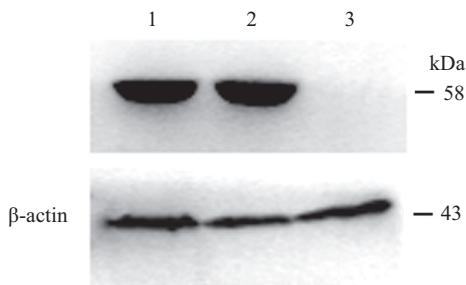


M1: DNA marker DL10000, M2: DNA marker DL2000; 1、2: HF2A和HF2A<sup>TM</sup>穿梭质粒未酶切的阴性对照; 3、4: 相应质粒的双酶切(*Xho* I、*Xba* I)的产物。

M1: DNA marker DL10000, M2: DNA marker DL2000; 1,2: negative control of HF2A and HF2A<sup>TM</sup> shuttle plasmids without digestion; 3,4: double digestion (*Xho* I, *Xba* I) product of the corresponding plasmids.

图2 重组穿梭质粒的双酶切鉴定结果

Fig.2 Restriction map of recombinant shuttle vector (*Xho* I, *Xba* I)



1: HF2A; 2: HF2A<sup>TM</sup>; 3: 空载组。

1: HF2A; 2: HF2A<sup>TM</sup>; 3: null.

图4 HF2A和HF2A<sup>TM</sup>蛋白在K562细胞中的表达鉴定  
Fig.4 The expression of HF2A and HF2A<sup>TM</sup> protein in K562 cells detected by Western blot

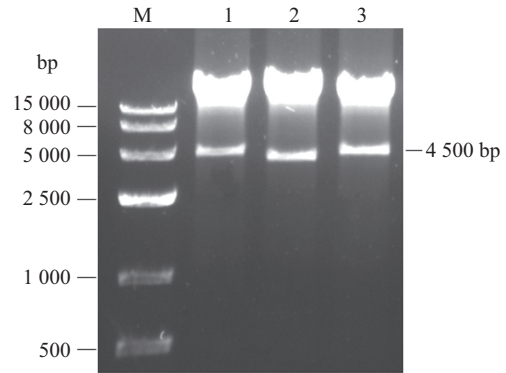
三轮扩增后, HF2A和HF2A<sup>TM</sup>两种病毒的滴度均达 $1.0 \times 10^{13}$  GTU/mL, 证明获得了高滴度的重组腺病毒。

## 2.5 目的蛋白在K562细胞中成功表达

HF2A和HF2A<sup>TM</sup>腺病毒感染K562细胞48 h后, Western blot成功检测到HA标签蛋白在K562细胞中的表达, 分子量约为58 kDa(图4), 分子量与DNAassist 2.0软件预测值相符, 证明HF2A和HF2A<sup>TM</sup>蛋白在K562细胞中表达正确。

## 2.6 FKBP-RAP-FRB系统转运胞浆BCR-ABL入核

FKBP-RAP-FRB系统处理K562细胞48 h后, Western blot检测胞浆、胞核蛋白中BCR-ABL的表达变化。结果显示, 实验组胞浆BCR-ABL的表达较突变组和空载组明显下降; 相应地, 实验组胞核BCR-

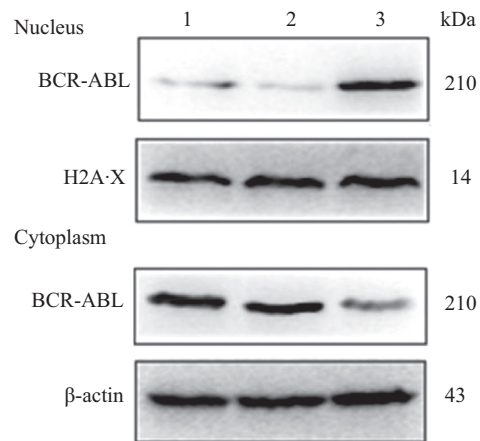


M: DNA marker DL15000; 1,2: HF2A腺病毒质粒的*Pac* I酶切产物; 3: HF2A<sup>TM</sup>腺病毒质粒的*Pac* I酶切产物。

M: DNA marker DL15000; 1,2: digestion (*Pac* I) product of HF2A adenovirus plasmids; 3: digestion (*Pac* I) product of HF2A<sup>TM</sup> adenovirus plasmid.

图3 重组腺病毒质粒的酶切(*Pac* I)鉴定

Fig.3 Restriction map of recombinant adenovirus plasmid (*Pac* I)



1: 空载组; 2: HF2A<sup>TM</sup>; 3: HF2A。

1: null; 2: HF2A<sup>TM</sup>; 3: HF2A.

图5 FKBP-RAP-FRB系统对BCR-ABL定位的影响  
Fig.5 Effect of FKBP-RAP-FRB system on the localization of BCR-ABL

ABL的表达明显增加, 而空载组和突变组几乎检测不到BCR-ABL的表达, 极其微弱的条带很可能是因为试剂盒本身导致的胞浆、胞核蛋白的不完全分离(图5)。结果证实, FKBP-RAP-FRB系统成功地将胞浆BCR-ABL转运入核。

## 2.7 FKBP-RAP-FRB系统抑制K562细胞生长

胞浆中的BCR-ABL是导致细胞异常生长的信号, 那么, BCR-ABL入核后是否抑制K562细胞生长呢? MTS实验显示, 实验组由于FKBP-RAP-FRB系统将胞浆中的BCR-ABL转运入核, K562细胞的生长明显受到抑制; 而突变组由于HF2A<sup>TM</sup>不能捕获

BCR-ABL, 与空载组细胞均生长良好(图5), 充分说明FKBP-RAP-FRB系统可通过转运BCR-ABL入核, 抑制K562细胞生长。

## 2.8 FKBP-RAP-FRB系统抑制K562细胞克隆形成能力

为了进一步证实BCR-ABL入核能够降低BCR-ABL的致癌能力, 我们检测了BCR-ABL入核后K562细胞的克隆形成能力。结果证实, 实验组的克隆形成能力较突变组和空载组均明显降低(图6、图7), 证实FKBP-RAP-FRB系统转运BCR-ABL入核后能够显著抑制K562细胞的克隆形成能力。

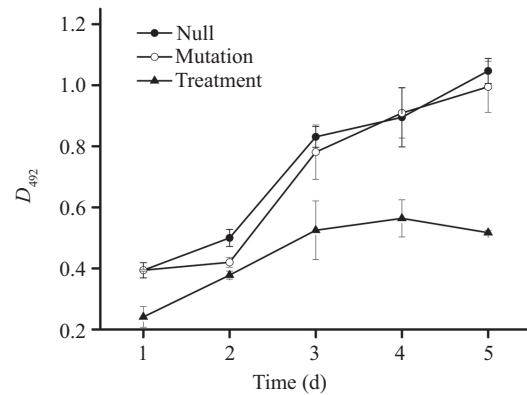


图6 FKBP-RAP-FRB系统对K562细胞生长的影响  
Fig.6 Effect of FKBP-RAP-FRB system on the growth of K562 cells

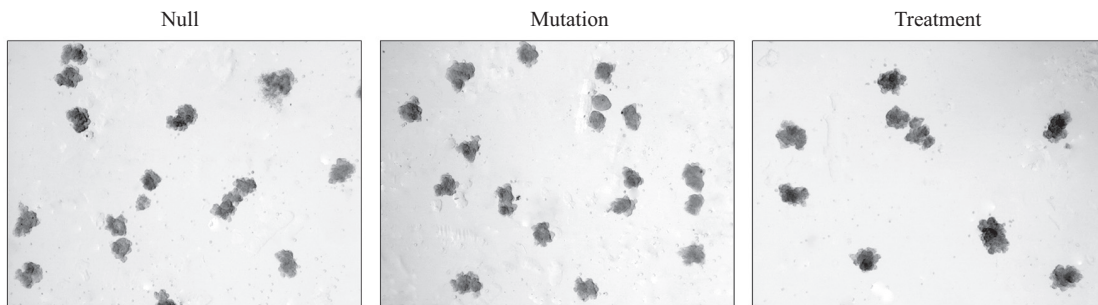


图7 FKBP-RAP-FRB系统对K562细胞克隆形成能力的影响  
Fig.7 Effect of FKBP-RAP-FRB system on the colony formation in K562 cells

## 3 讨论

目前, 伊马替尼是治疗CML的一线药物。但是, BCR-ABL激酶区等突变导致约1/3的CML患者对伊马替尼耐药<sup>[8]</sup>。因此, 仍然需要寻求新的治疗方法。

*bcr*与*c-Abl*基因融合后, 一方面使BCR-ABL具有组成性激活的酪氨酸激酶活性, 持续激活*Ras*、*PI3K*、*STAT5*等促增殖因子, 导致细胞恶性转化。另一方面, 使BCR-ABL不能进入细胞核, 只能定位于细胞浆, 使*c-Abl*不能入核发挥正常的增殖调控作用<sup>[2]</sup>。如果能使BCR-ABL入核, 再借助其组成性激活的酪氨酸激酶活性, 应该就能发挥与*c-Abl*类似的调节作用。Aloisi等<sup>[9]</sup>发现, 伊马替尼处理CML细胞后, BCR-ABL有入核的现象, 如果再同时使用莱普霉素B(leptomycin B, LMB), 将入核的BCR-ABL保留在核内, 将增强对CML细胞的增殖抑制效应。Dixon等<sup>[10]</sup>也证实, 在K562细胞内表达BCR-ABL与NLS的融合蛋白, 能够发挥抑增殖效应。但是, 这些研究只停留在机制研究层面上, 如何行之有效地将BCR-ABL转运入核是亟待解决的问题。

FKBP-RAP-FRB系统可利用FKBP和FRB高亲

和力的作用, 同时RAP使该系统的可控性增强, 可达到时间和剂量的双重控制, 是转运BCR-ABL入核较为理想的工具。FKBP-RAP-FRB系统在基因治疗研究中得到了广泛的应用<sup>[3]</sup>。

Rin1蛋白可通过其脯氨酸富含序列与BCR-ABL SH2和SH3序列高亲和力、高特异性结合, 将Rin1蛋白能够结合BCR-ABL的这段序列称为ABD, 是捕获BCR-ABL的良好选择<sup>[11]</sup>。因此, 本课题的思路是将3NLS与FRB\*融合, 将ABD与FKBP融合, 在K562细胞内同时表达FN3R和HF2A两个融合蛋白, 在AP21967诱导FKBP和FRB\*高亲和力的作用下, 将NLS逐级传递给BCR-ABL, 从而转运BCR-ABL入核, 并检测BCR-ABL入核后对K562细胞增殖的影响。

综上所述, 本研究成功地将ABD克隆入前期构建的pHF2穿梭载体中, 与腺病毒骨架质粒pAd5F35同源重组, 在AD-293细胞中包装、扩增出了高滴度的重组腺病毒, 滴度达 $1.0 \times 10^{13}$  GTU/mL, 并成功地在K562细胞中表达了目的蛋白。在K562细胞中共表达HF2A和FN3R蛋白, 经AP21967诱导, 成功地将胞浆中的BCR-ABL转运入核。在相关研究中<sup>[12]</sup>, 我

们通过Pull down实验证实HF2A确实能够捕获BCR-ABL,增加了本研究结果的可靠性,证实FKBP-RAP-FRB系统用于转运BCR-ABL切实可行。BCR-ABL入核后,有效地抑制了K562细胞增殖,证明FKBP-RAP-FRB系统转运BCR-ABL入核有望成为治疗CML的新方法。

### 参考文献 (References)

- 1 Klein A, Maldonado C, Vargas LM, Gonzalez M, Robledo F, Perez de Arce K, *et al.* Oxidative stress activates the c-Abl/p73 proapoptotic pathway in Niemann-Pick type C neurons. *Neurobiol Dis* 2011; 41(1): 209-18.
- 2 Preyer M, Vigneri P, Wang JY. Interplay between kinase domain autophosphorylation and F-actin binding domain in regulating imatinib sensitivity and nuclear import of BCR-ABL. *PLoS One* 2011; 6(2): e17020.
- 3 Rodriguez Camargo DC, Link NM, Dames SA. The FKBP-rapamycin binding domain of human TOR undergoes strong conformational changes in the presence of membrane mimetics with and without the regulator phosphatidic acid. *Biochemistry* 2012; 51(24): 4909-21.
- 4 Stankunas K, Bayle JH, Havranek JJ, Wandless TJ, Baker D, Crabtree GR, *et al.* Rescue of degradation-prone mutants of the FK506-rapamycin binding (FRB) protein with chemical ligands. *Chembiochem* 2007; 8(10): 1162-9.
- 5 Hu H, Bliss JM, Wang Y, Colicelli J. RIN1 is an ABL tyrosine kinase activator and a regulator of epithelial-cell adhesion and migration. *Curr Biol* 2005; 15(9): 815-23.
- 6 李千音,黄峥兰,高 淼,钟 梁,冯文莉. 重组腺病毒Ad5/F35-HF2S的构建及其鉴定. *中国生物制品学杂志*(Li Qianyin, Huang Zhenglan, Gao Miao, Zhong Liang, Feng Wenli. Construction and identification of recombinant adenovirus Ad5/F35-HF2S. *Chinese Journal of Biologicals*) 2012; 25(11): 35-9.
- 7 高 淼,黄峥兰,李千音,钟 梁,冯文莉. 嵌合腺病毒Ad5F35-FLAG-3NLS-FRB\*的构建与鉴定. *中国生物制品学杂志*(Gao Miao, Huang Zhenglan, Li Qianyin, Zhong Liang, Feng Wenli. Construction and identification of chimeric adenovirus Ad5F35-FLAG-3NLS-FRB\*. *Chinese Journal of Biologicals*) 2012; 25(10): 1076-80.
- 8 Rumpold H, Webersinke G. Molecular pathogenesis of Philadelphia-positive chronic myeloid leukemia — is it all BCR-ABL? *Curr Cancer Drug Targets* 2011; 11(1): 3-19.
- 9 Aloisi A, Di Gregorio S, Stagno F, Guglielmo P, Mannino F, Sormani MP, *et al.* BCR-ABL nuclear entrapment kills human CML cells: *ex vivo* study on 35 patients with the combination of imatinib mesylate and leptomyacin B. *Blood* 2006; 107(4): 1591-8.
- 10 Dixon AS, Kakar M, Schneider KM, Constance JE, Paullin BC, Lim CS. Controlling subcellular localization to alter function: Sending oncogenic Bcr-Abl to the nucleus causes apoptosis. *J Control Release* 2009; 140(3): 245-9.
- 11 Lim YM, Wong S, Lau G, Witte ON, Colicelli J. BCR/ABL inhibition by an escort/phosphatase fusion protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97(22): 12233-8.
- 12 高 淼,黄峥兰,李千音,李 会,钟 梁,冯文莉. HA-2FKBP-ABD融合蛋白的原核表达及与BCR-ABL的相互作用. *临床检验杂志*(Gao Miao, Huang Zhenglan, Li Qianyin, Li Hui, Zhong Liang, Feng Wenli. Prokaryotic expression of HA-2FKBP-ABD fusion protein and its interaction with BCR-ABL. *Chinese Journal of Clinical Laboratory Science*) 2013; 31(4): 268-71.