

SPARC基因过表达对SKM-1细胞凋亡的影响

年青 魏春梅 黄婧 但春莉 肖青 杨泽松 王利*

(重庆医科大学附属第一医院血液科, 重庆 400001)

摘要 构建SPARC基因过表达载体, 转染人骨髓增生异常综合征(myelodysplastic syndrome, MDS)细胞系SKM-1细胞, 探讨SPARC基因过表达对人MDS细胞系SKM-1细胞凋亡的影响。以pcDNA-SPARC为引物, PCR扩增SPARC基因; 将靶基因克隆入慢病毒载体pGC-GV, 构建含有SPARC基因的重组慢病毒载体pGC-GV-SPARC, 测序检测正确性; 将构建载体pGC-GV-SPARC转染人MDS细胞系SKM-1, 流式细胞术检测转染效率, RT-PCR检测SKM-1细胞中SPARC mRNA表达, Western blot检测SPARC蛋白表达, MTS法测定小剂量阿糖胞苷(30 ng/mL)对实验组增殖抑制的影响, Annexin V检测SPARC基因转染后对人SKM-1细胞凋亡的影响。结果显示, 构建含有SPARC基因的重组慢病毒载体pGC-GV-SPARC转染效率为(64.25±1.42)%; 转染后, SPARC mRNA及蛋白表达在靶细胞中较对照组增多。小剂量阿糖胞苷对转染组的增殖抑制率明显高于其他组。SPARC基因转染后人SKM-1细胞凋亡率较未转染组明显增高, 加入阿糖胞苷后人SKM-1细胞凋亡率较对照组明显增高。由此说明, 作者成功构建了携带人SPARC基因的慢病毒载体, 转染人SKM-1细胞系后稳定表达SPARC基因, SPARC过表达可抑制细胞增殖, 且联合小剂量阿糖胞苷(30 ng/mL)更有效地抑制SKM-1细胞的增殖, 并诱导其凋亡。

关键词 SPARC基因; 阿糖胞苷; 慢病毒载体; 骨髓增生异常综合征

Effects of SPARC Gene Overexpression on Proliferation and Apoptosis of SKM-1 Cells

Nian Qing, Wei Chunmei, Huang Jing, Dan Chunli, Xiao Qing, Yang Zesong, Wang Li*

(Department of Hematology, the First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract To construct a recombinant lentiviral vector carrying SPARC gene, we investigated the alteration on the proliferation of MDS cell line SKM-1 cells. The SPARC was obtained using pcDNA-SPARC by PCR. The SPARC gene was cloned into a lentiviral vector pGC-GV to construct a recombinant lentiviral vector carrying SPARC gene named pGC-GV-SPARC, which was confirmed to be correct by DNA sequencing. pGC-GV-SPARC was used to transfect human MDS cell line SKM-1. The transfection efficiency, SPARC mRNA and protein expression were detected by flow cytometry, RT-PCR and Western blot, respectively. The MTS method was used to determine inhibition effects of low doses of Ara-C in different groups. Results showed that the recombinant lentiviral vector pGC-GV-SPARC was confirmed to be correct by DNA sequencing. The transfection efficiency was (64.25±1.42)%, and stably expressed. RT-PCR and Western blot showed that the expression of SPARC was increased. MTS results showed that the proliferation effect of low doses of Ara-C on the inhibition rate of transfection group

收稿日期: 2013-11-07 接受日期: 2013-12-23

国家自然科学基金(批准号: 81250034、30971277)和重庆市科委基金(批准号: CSTC2009BB5070)资助的课题

*通讯作者。Tel: 023-89011508, E-mail: liwangls@yahoo.com

Received: November 7, 2013 Accepted: December 23, 2013

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.81250034, 30971277) and Chongqing Natural Science Foundation (Grant No.CSTC2009BB5070)

*Corresponding author. Tel: +86-23-89011508, E-mail: liwangls@yahoo.com

网络出版时间: 2014-03-28 16:47 URL: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.11844/cjcb.2014.04.0366.html>

was significantly higher than those of negative group and SKM-1 group. The results showed that lentiviral vector carrying *SPARC* was constructed successfully, and the expression of *SPARC* could effectively increased by pGC-GV-*SPARC*, which could inhibit the proliferation of SKM-1 cell and promote its apoptosis by combining with low doses of Ara-C.

Key words *SPARC* gene; cytosine arabinoside; lentiviral vector; myelodysplastic syndrome

骨髓增生异常综合征(myelodysplastic syndrome, MDS)是一组起源于多能干细胞或造血系定向干细胞的异质性克隆性疾病, 主要特征是无效造血和高危演变为急性髓系白血病, 临床表现为造血细胞在质和量上出现不同程度的异常变化^[1]。MDS多发生于中老年人, 且发病率呈逐年增高的趋势。临床上尚缺乏有效的治疗方法^[2], 因而, 阐明该病发病机制、探索新型治疗方法显得很有必要, 其中以基因为靶标的定向治疗研究是目前MDS基础研究的热点之一。

染色体异常是MDS最常见的遗传生物学改变, 染色体缺失通常与肿瘤抑癌基因相关联, 抑癌基因通过单倍剂量不足引发肿瘤生成。*SPARC*基因位于5号染色体共缺失区^[3], 编码调节细胞间质相互作用因子, 产物为富含半胱氨酸的酸性蛋白, 同时也被认为具有抗黏连性^[4]。研究显示, *SPARC*单倍剂量不足与5q-综合征发病有关, 在5q-综合征中该基因发挥抑癌基因作用, 且联合药物来那度胺有很好的治疗效果, 而在非5q-MDS中该基因也呈低表达^[5], 但具体作用尚不清楚。故明确*SPARC*基因在非5q-MDS中的作用, 对阐明MDS的发病机制及明确该基因的靶向治疗的可能性具有同样重要的意义。

阿糖胞苷(cytosine arabinoside, Ara-C)是治疗MDS常用的联合化疗药物之一。阿糖胞苷为嘧啶类抗代谢药, 干扰或阻止细胞DNA合成, 且抑制细胞周期的S期, 抑制细胞生长。临床上认为, 阿糖胞苷可剂量依赖性诱导细胞凋亡, 主要在细胞周期调节中发挥作用。而近期研究显示, 阿糖胞苷可诱导静止期及增殖期肿瘤细胞凋亡^[6]。阿糖胞苷不仅对治疗恶性血液病有很好的疗效, 同时它也对肺癌、消化道癌、头颈部癌有效, 对病毒性角膜炎及流行性结膜炎等也有一定疗效, 是治疗恶性肿瘤常用的化疗药物之一。

在对MDS研究中, *SPARC*与非5q-MDS细胞增殖凋亡是否有关, *SPARC*基因表达量的改变是否使得阿糖胞苷对细胞抑制作用有变化, 这些都少见报道。本实验旨在用慢病毒构建*SPARC*基因过表达模

型, 初步探究*SPARC*对非5q-MDS细胞增殖凋亡的影响以及小剂量阿糖胞苷对细胞抑制的改变。

1 材料与方法

1.1 主要材料

构建慢病毒载体系统由pGC-GV载体、pHel-per1.0载体和pHelper2.0载体组成(上海吉凯基因化学技术有限公司提供); 大肠埃希菌DH5 α 、293T细胞本室保存; 人MDS细胞系SKM-1由华中科技大学同济医学院周剑锋教授馈赠。

1.2 主要试剂

Lipofectamine 2000(Invitrogen公司); Plasmid抽提Kit(Qiagen公司); 阿糖胞苷(Sigma公司), 相对分子量为243.22; RPMI-1640、胎牛血清(GIBCO公司); Taq polymerase、Primer、dNTP(TaKaRa公司); *SPARC*抗体、二抗(山羊抗鼠)(Abcam公司); 琼脂糖(赛百盛公司); MTS(Promega公司)。

1.3 慢病毒pGC-GV-*SPARC*载体构建及病毒包装

运用PCR技术对目的基因*SPARC*进行扩增, 反应条件为: 95 °C预变性5 min; 95 °C变性30 s, 56 °C退火30 s, 72 °C延伸1 min, 循环30次; 最后72 °C延伸10 min。将目的基因克隆到慢病毒表达质pGC-GV Vector中, 所用引物上游序列为: 5'-CTG CCA CTT CTT TGC CAC AAA TC-3', 下游序列: 5'-GTG AAG AAG ATC CAT GAG AAT TT-3', PCR反应条件为: 95 °C预变性2 min; 95 °C变性30 s, 60 °C退火30 s, 72 °C延伸50 s, 循环30次; 最后72 °C延伸6 min。送上海吉凯公司测序。LB培养液扩增转化菌DH5 α , Plasmid抽提盒提取pGC-GV-*SPARC*及包装质粒pHelper1.0、pHelper2.0的DNA。根据Invitrogen公司Lipofectamine 2000说明书将构建质粒pGC-GV-*SPARC*与慢病毒包装质粒pHelper1.0、pHelper2.0共转染293T细胞, 出现强绿色荧光细胞融合现象时, 收集含慢病毒颗粒的细胞上清液, -80 °C保存。

1.4 细胞培养

SKM-1培养于加10%胎牛血清的RPMI-1640中,

细胞置于37 °C、5% CO₂饱和湿度的孵箱中培养, 平均2 d传代1次, 用对数生长期细胞完成实验。

1.5 SKM-1细胞转染

细胞接种于6孔板中, 每孔以5×10⁴细胞培养24 h, 按感染复数(MOI值)为100转染, 分pGC-GV-SPARC(转染组)和pGC-GV-EGFP(阴性对照组), 同时设立不加病毒的空白组(SKM-1)。转染后第6 d测转染效率。

1.6 RT-PCR

用RNAiso Plus试剂盒提取RNA, 并将其逆转录成cDNA。每孔加入12.5 μL Taq酶, 1 μL上下游引物(10 μmol/L), 2 μL cDNA反应液(50 ng/μL)以及8.5 μL ddH₂O, 总体积为25 μL。在3%的琼脂糖凝胶中行电泳, 结果用Quantity one软件分析。SPARC引物F: 5'-ACC TGT CAC TGT CTT GTA CCC TTG T-3', R: 5'-CGG CGT TTG GAG TGG TAG AA-3'。RT-PCR反应条件为: 97 °C预变性5 min; 97 °C变性1 min, 56 °C退火30 s, 72 °C延伸30 s, 共循环30次; 然后72 °C延伸7 min。

1.7 Western blot检测蛋白

各组细胞用100 μL RIPA裂解液和1 μL PMSF裂解30 min, 12 000 r/min离心15 min, 留取上清液, 用BCA蛋白试剂检测蛋白浓度。在50 μg体积下行SDS-PAGE电泳, 后用PVDF膜转膜, 5%脱脂牛奶封闭PVDF膜2 h。按1:1 000比例稀释一抗, 在4 °C下孵育PVDF膜过夜。次日用TBST洗3次, 每次15 min, 按1:10 000比例稀释二抗, 37 °C下, 孵育PVDF膜1 h, 接着用TBST洗膜, 方法同前。最后ECL显影。

1.8 MTS法检测细胞增殖

取对数生长期细胞接种于96孔板中。每孔约5×10³细胞, 实验组分为SPARC过表达+Ara-C组、SPARC过表达组、空病毒+Ara-C组、空病毒组、SKM-1+Ara-C组和SKM-1细胞组, 共六组, 每组设立4个平行复孔。分别于24, 48, 72 h后加入MTS试剂(30 ng/mL)20 μL/孔, 37 °C的5% CO₂饱和湿度孵箱中静置1 h, 酶调仪在490 nm的波长下读取D值, 各平行孔取平均值。依照公式计算细胞抑制。细胞抑制率(%)=[1-实验组D₄₉₀值/对照组D₄₉₀值]×100%。实验独立重复3次。

1.9 Annexin V/7-AAD检测细胞凋亡

收集对数期各组细胞, 用PBS洗两遍, 加入200 μL Binding Buffer、10 μL Annexin V-PE和5 μL

7-AAD, 避光静置15 min, 加入300 μL Binding Buffer, 流式细胞仪检测细胞凋亡的变化, 结果用CellQuest软件分析凋亡百分率。

1.10 统计学处理

数据采用GraphPad Prism 5统计软件进行处理, 以 $\bar{x}\pm s$ 表示, 两组间比较 t 检验, 多组间比较采用单因素方差分析, 均数间两两比较采用 q 检验, $P<0.05$ 为差异具有显著性。

2 结果

2.1 载体酶切产物鉴定

慢病毒载体pGC-GV-EGFP行酶切, 所得产物于2%琼脂糖凝胶电泳, 电泳结果见图1A。酶切产物于第2泳道, 9 983 bp处有特异条带, 结果与预期一致, 用于后续连接反应。

2.2 SPARC基因克隆PCR产物凝胶电泳

用pcDNA-SPARC为模板的引物PCR扩增SPARC基因, 如图1B所示, 获得955 bp目的片段, 说明抽提SPARC成功。

2.3 pGC-GV-SPARC过表达载体的阳性克隆鉴定

pGC-GV-SPARC过表达慢病毒载体阳性克隆PCR产物片段大小为627 bp, 与酶切鉴定产物片段大小一致。阳性结果测序得出pGC-GV-SPARC中SPARC序列与Genbank中正常SPARC序列完全一致, 如图1C所示, 说明获得正确表达产物。

2.4 SPARC重组慢病毒载体在SKM-1细胞中的绿色荧光蛋白表达及转染效率的检测

将pGC-GV-SPARC质粒转染入人MDS细胞系SKM-1后, 荧光显微镜下观察其荧光表达。对比相差显微镜其荧光表达较多, 且流式细胞术检测转染效率达(64.25±1.42)%(图2), 证明慢病毒高效转染了人MDS细胞系SKM-1。

2.5 RT-PCR检测SPARC mRNA表达

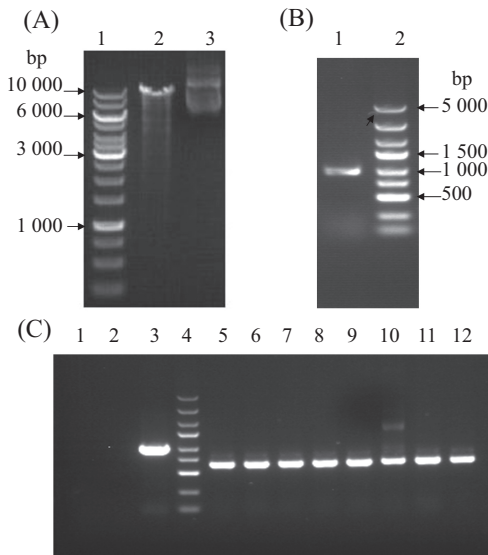
慢病毒载体pGC-GV-SPARC转染SKM-1细胞第6 d后, SPARC mRNA表达明显高于空白组和空病毒组(图3), 经分析表达水平差异有统计学意义。

2.6 Western blot检测SPARC蛋白稳定表达

转染后, SPARC蛋白表达量明显高于其他实验组(图4), 分析表明差异有统计学意义。

2.7 阿糖胞苷对人SKM-1细胞增殖的影响

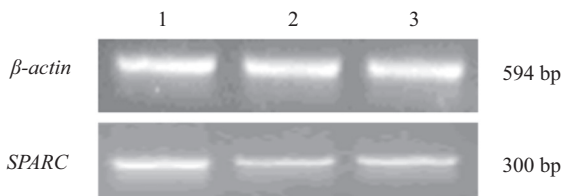
慢病毒载体和(或)小剂量阿糖胞苷作用于各组24, 48, 72 h后, MTS检测结果显示, 不同时间点SPARC



A: pGC-GV-EGFP载体酶切产物电泳结果(1: marker; 2: 酶切产物; 3: 未酶切载体); B: PCR获得目的基因*SPARC*片段的电泳结果(1: *SPARC*; 2: marker); C: PCR鉴定pGC-GV-*SPARC*重组克隆(1: 阴性对照, ddH₂O); 2: 空载体对照; 3: 阳性对照; 4: marker(自上而下依次为3 Kb、2 Kb、1.5 Kb、1 Kb、750 bp、500 bp、250 bp、100 bp); 5~12: *SPARC*转化子。

A: pGC-GV-EGFP enzyme electrophoresis results of PCR products (1: marker; 2: enzyme products; 3: unenzyme products); B: the sequencing result of target gene *SPARC* by PCR (1: *SPARC*; 2: maker); C: PCR detect recombinant clone of pGC-GV-*SPARC* (1: negative control, ddH₂O); 2: null vectors; 3: positive; 4: marker (from top to bottom are 3 Kb, 2 Kb, 1.5 Kb, 1 Kb, 750 bp, 500 bp, 250 bp, 100 bp); 5~12: *SPARC* plasmid.

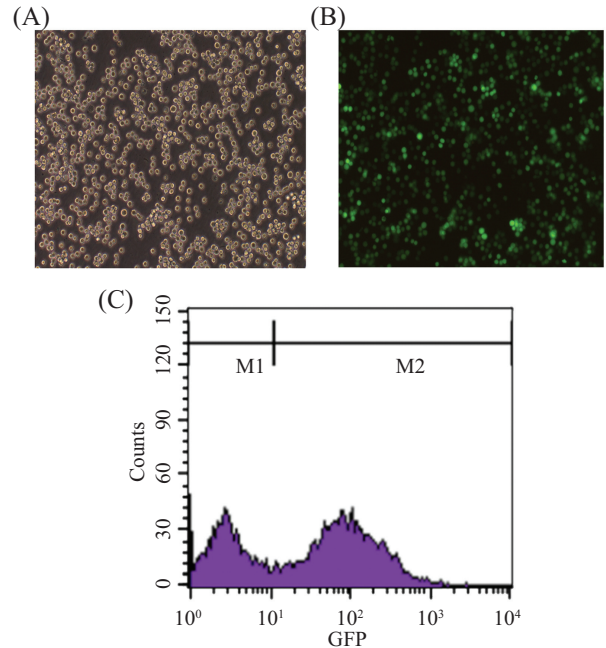
图1 载体酶切产物及pGC-GV-*SPARC*重组阳性克隆的鉴定结果
Fig.1 Enzyme products and identification of pGC-GV-*SPARC*



1: pGC-GV-*SPARC*转染组; 2: 空载体pGC-GV-EGFP组; 3: 空白组。
1: pGC-GV-*SPARC* transfected group; 2: negative group; 3: SKM-1.

图3 RT-PCR检测pGC-GV-*SPARC*转染SKM-1细胞后第6 d *SPARC* mRNA表达

Fig.3 *SPARC* mRNA expression of different groups transfected by pGC-GV-*SPARC* detected by RT-PCR after 6 days

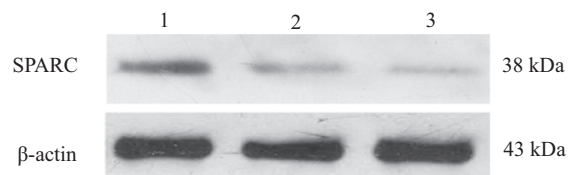


A: SKM-1细胞(倒置相差显微镜, 400×); B: 转染了pGC-GV-*SPARC*的SKM-1细胞(倒置荧光显微镜, 400×); C: 流式细胞术检测效率, M1表示无EGFP表达的细胞比例(35.83%±1.12%), M2表示有EGFP表达的细胞比例(64.25%±1.42%)。

A: SKM-1 cells (400×); B: the infected of SKM-1 cells by pGC-GV-*SPARC*; C: the transfection efficiency detected by flow cytometry; M1: no EGFP, the transfection efficiency was 35.83%±1.12%; M2: EGFP, the transfection efficiency was 64.25%±1.42%.

图2 pGC-GV-*SPARC*慢病毒载体转染SKM-1细胞后第6 d EGFP表达及转染效率

Fig.2 The EGFP expression and transfection effect of SKM-1 cells transfected by pGC-GV-*SPARC* after 6 days



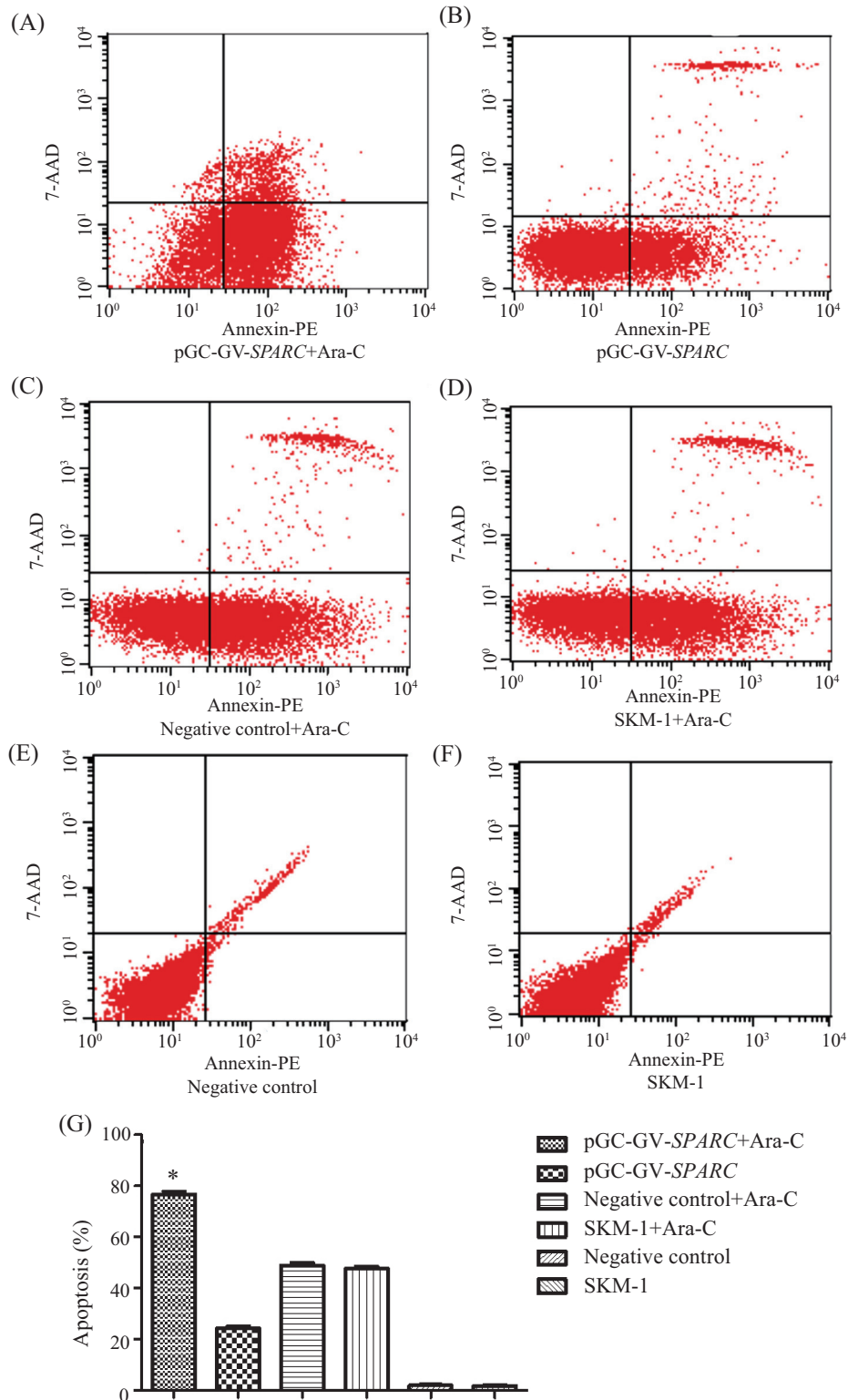
1: pGC-GV-*SPARC*转染组; 2: 空载体pGC-GV-EGFP组; 3: 空白组。
1: pGC-GV-*SPARC* transfected group; 2: pGC-GV-EGFP group; 3: SKM-1.

图4 Western blot检测pGC-GV-*SPARC*转染SKM-1细胞后第6 d *SPARC*蛋白表达

Fig.4 *SPARC* protein expression of different groups transfected by pGC-GV-*SPARC* detected by Western blot after 6 days

表1 MTS检测各组小剂量阿糖胞苷对SKM-1细胞生长抑制的影响($\bar{x}\pm s$)(%)
Table 1 Effects of low dose Ara-C inhibit SKM-1 cells detected by MTS ($\bar{x}\pm s$)(%)

组别 Groups	24 h	48 h	72 h
pGC-GV- <i>SPARC</i> +Ara-C	44.451±1.545	62.152±1.081	76.417±1.372
pGC-GV- <i>SPARC</i>	16.111±1.041	21.311±1.402	30.524±1.056
Negative control+Ara-C	24.877±2.742	36.573±1.292	43.892±1.223
Negative control	4.483±1.491	6.996±1.577	7.112±2.342
SKM-1+Ara-C	23.831±1.357	31.197±1.231	41.889±1.352
SKM-1 group	-	-	-



A: pGC-GV-SPARC+阿糖胞苷; B: 转染组不加阿糖胞苷; C: 空病毒组+阿糖胞苷; D: SKM-1细胞+阿糖胞苷; E: 空病毒组不加阿糖胞苷; F: SKM-1细胞; G: * $P < 0.01$, 与其他组比较。

A: pGC-GV-SPARC+Ara-C; B: pGC-GV-SPARC group; C: negative control+Ara-C; D: SKM-1+Ara-C; E: negative control; F: SKM-1; G: * $P < 0.01$ vs other groups.

图5 药物作用72 h后, 不同实验组细胞的凋亡结果

Fig.5 Effects of the apoptosis results in different groups after 72 h drug treatment

过表达+Ara-C组的细胞增殖明显下降, *SPARC*过表达+Ara-C组与其他各实验组间经单因素方差分析统计显示 $P<0.05$, 说明*SPARC*+Ara-C对细胞增殖抑制率的增高具有统计学意义; *SPARC*过表达组、空病毒组及SKM-1组之间差异显著($P<0.05$), 说明*SPARC*过表达本身可使细胞凋亡增多(表1)。

2.8 Annexin V/7-AAD检测各组细胞凋亡的结果

根据MTS结果得出, 药物作用72 h后各组细胞抑制率较高, 因此该研究选择药物作用72 h后检测各组细胞凋亡率。 *SPARC*过表达组、*SPARC*过表达+Ara-C组细胞凋亡率显著增高, 与其他组相比差异有统计学意义($P<0.01$); *SPARC*过表达+Ara-C组的细胞凋亡率最高, 与*SPARC*过表达组相比差异有统计学意义($P<0.01$)(图5)。

3 讨论

研究发现, *SPARC*基因的作用存在较大的异质性。 *SPARC*通过与细胞外基质的相互作用表现出多种生物学活性, 其中最主要的特征是*SPARC*基因正常表达可调节细胞的增殖及组织分化和胚胎发育^[7]。 *SPARC*在多数恶性肿瘤中被证实表达下调, 它的降低导致抑制细胞增殖的自身调节信号减弱, 从而促进肿瘤细胞的增殖及迁移。例如, 在胰腺癌和肺癌中*SPARC*抑癌基因发挥的作用就有所降低^[8]。但在结直肠癌、恶性黑色素瘤、乳腺癌中, *SPARC*基因呈高表达, 发挥癌基因作用^[9-10], 具体机制尚待进一步研究。 *SPARC*单倍剂量不足可增加肿瘤细胞基质之间的黏附性从而导致MDS细胞增殖, 同时*SPARC*表达降低可影响5q-综合征细胞的增殖^[11]。因此我们认为, *SPARC*可能在非5q-MDS细胞的增殖凋亡中也发挥重要作用。

研究MDS的细胞模型主要有MUTZ-8、MUTZ-1和SKM-1, 其中MUTZ-8细胞遗传学检测存在5q缺失^[12], 因此是研究5q-综合征的理想细胞模型。SKM-1具有多种核型异常, 不具有5q^[13-14], 而MUTZ-1已被证明是伪MDS细胞^[15]。本课题组已对*SPARC*基因表达降低对MDS细胞的影响做了研究, 发现*SPARC*表达降低影响细胞增殖(结果在发表中)。与之相对应, 本研究拟对该基因过表达的作用做一探讨, 选择非5q-的细胞系, 而SKM-1细胞为该研究的理想模型。

此外, 慢病毒载体来自于人类免疫缺陷型病毒

(HIV), 对分裂细胞和非分裂细胞均有感染能力, 能长期表达。较腺病毒而言, 慢病毒经包装后能高效、稳定转染悬浮细胞、原代细胞等^[16], 因此本研究以慢病毒作为基因载体。经测序鉴定和Western blot检测验证, 本研究成功构建pGC-GV-*SPARC*过表达慢病毒载体。进一步将*SPARC*基因转入SKM-1细胞, 5 d后经流式细胞术检测SKM-1转染效率达(64.25±1.42)%。RT-PCR及Western blot结果均显示, *SPARC* mRNA及蛋白表达增多。经统计学分析, 差异有统计学意义($P<0.05$)。该结果有力地证实了*SPARC*过表达模型构建成功, 说明慢病毒作为载体能高效、稳定转染SKM-1细胞, 并对细胞毒性较小, 这有助于深入研究*SPARC*在非5q-MDS细胞增殖凋亡中的作用机制。

细胞周期特异性药物阿糖胞苷存在时间、剂量相关性, 临床上对阿糖胞苷的应用分高、中、低剂量^[17]。本实验选用低剂量阿糖胞苷能更好地说明*SPARC*基因表达增多后, 阿糖胞苷对其细胞增殖抑制的影响。细胞凋亡对细胞正常发育及内环境稳定有至关重要的影响。恶性增殖及凋亡受阻促使了肿瘤的发生, 因此阻碍细胞增殖、促进细胞凋亡成为肿瘤治疗的有效方法。

本研究中, MTS实验结果显示, *SPARC*基因过表达后使SKM-1细胞增殖抑制, 同时*SPARC*过表达组加入小剂量阿糖胞苷后细胞增殖抑制率明显较其他实验组高。Annexin V检测凋亡结果显示, *SPARC*过表达明显抑制SKM-1细胞增殖凋亡率可达(23.972±1.232)%($P<0.01$), 且联合小剂量阿糖胞苷作用细胞凋亡达(75.964±1.313)%, 与细胞对照组、空病毒组及过表达组或Ara-C组比较, 差异具有统计学意义($P<0.01$)。 *SPARC*的这种作用与其在5q-综合征中的作用相同, 同时, *SPARC*在肺癌及前列腺癌中也发挥同样的作用。 *SPARC*过表达联合阿糖胞苷使得凋亡增强考虑可能与公认的抑癌基因*p53*及其他凋亡基因如Caspase家族的改变有关, 但具体对细胞增殖影响机制需进一步研究。

综上所述, 本研究构建的*SPARC*过表达载体能有效提高非5q-MDS细胞SKM-1中该基因的表达, *SPARC*基因过表达本身对非5q-MDS细胞有增殖抑制的作用, 且联合小剂量阿糖胞苷作用于细胞能更加有效地抑制SKM-1细胞的增殖并促使其凋亡。在治疗非5q-MDS时, 我们可将提高*SPARC*表达的藥物

如雷那度胺等^[18]同阿糖胞苷及其他化疗药物联合作用, 会获得更好的效果。靶基因表达量的改变联合阿糖胞苷作用后产生的影响将为靶向治疗MDS甚至其他肿瘤疾病提供新思路、新途径。

参考文献 (References)

- 1 Nimer SD. Myelodysplastic syndromes. *Blood* 2008; 111(10): 4841-51.
- 2 Zandberg DP, Huang TY, Ke X, Baer MR, Gore SD, Smith SW, *et al.* Treatment and outcomes for chronic myelomonocytic leukemia compared to myelodysplastic syndromes in older adults. *Haematologica* 2013; 98(4): 584-90.
- 3 Boultonwood J, Pellagatti A, Wainscoat JS. 5q- syndrome. *Curr Pharm Des* 2012; 18(22): 3180-3.
- 4 Boultonwood J, Pellagatti A, Cattani H, Lawire CH, Giagounidis A, Malcovati L, *et al.* Gene expression profiling of CD34⁺ cells in patients with the 5q- syndrome. *Br J Haematol* 2007; 139(4): 578-89.
- 5 Davids MS, Steensma DP. The molecular pathogenesis of myelodysplastic syndromes. *Cancer Biol Ther* 2010; 10(4): 309-19.
- 6 de Vries JF, Falkenburg JH, Willemze R, Barge RM. The mechanisms of Ara-C-induced apoptosis of resting B-chronic lymphocytic leukemia cells. *Haematologica* 2006; 91(7): 912-9.
- 7 Swaminathan SS, Oh DJ, Kang MH, Ren R, Jin R, Gong H, *et al.* Secreted protein acidic and rich in cysteine (SPARC)-null mice exhibit more uniform outflow. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2013; 54(3): 2035-47.
- 8 Hsiao YH, Lien HC, Hwa HL, Kuo WH, Chang KJ, Hsieh FJ. SPARC (osteonectin) in breast tumors of different histologic types and its role in the outcome of invasive ductal carcinoma. *Breast J* 2010; 16(3): 305-8.
- 9 Yin J, Chen G, Liu Y, Liu S, Wang P, Wan Y, *et al.* Downregulation of SPARC expression decreases gastric cancer cellular invasion and survival. *J Exp Clin Cancer Res* 2010; 29: 59.
- 10 Horie K, Tsuchihara M, Nakatsura T. Silencing of secreted protein acidic and rich in cysteine inhibits the growth of human melanoma cells with G arrest induction. *Cancer Sci* 2010; 101(4): 913-9.
- 11 Jadersten M, Hellstrom-Lindberg E. New clues to the molecular pathogenesis of myelodysplastic syndromes. *Exp Cell Res* 2010; 316(8): 1390-6.
- 12 Hu ZB, MacLeod RA, Meyer C, Quentmeier H, Drexler HG. New acute myeloid leukemia-derived cell line: MUTZ-8 with 5q. *Leukemia* 2002; 16(8): 1556-61.
- 13 Nakagawa T, Matozaki S. The SKM-1 leukemic cell line established from a patient with progression to myelomonocytic leukemia in myelodysplastic syndrome (MDS)-contribution to better understanding of MDS. *Leuk Lymphoma* 1995; 17(3/4): 335-9.
- 14 Kimura S, Kuramoto K, Homan J, Naruoka H, Ego T, Nogawa M, *et al.* Antiproliferative and antitumor effects of azacitidine against the human myelodysplastic syndrome cell line SKM-1. *Anticancer Res* 2012; 32(3): 795-8.
- 15 Chen BG, Guo QY, Zhang Y, Yan WH, Pan YQ, Zheng R, *et al.* Effect of rapamycin on apoptosis in human myelodysplastic syndrome cell line MUTZ-1 and its possible mechanisms. *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi* 2010; 18(2): 300-4.
- 16 Matrai J, Chuah MK, van den Driessche T. Recent advances in lentiviral vector development and applications. *Mol Ther* 2010; 18(3): 477-90.
- 17 Fukushima T, Urasaki Y, Yamaguchi M, Ueda M, Morinaga K, Haba T, *et al.* A randomized comparison of modified intermediate-dose Ara-C versus high-dose ara-c in post-remission therapy for acute myeloid leukemia. *Anticancer Res* 2012; 32(2): 643-7.
- 18 Duong VH, Komrokji RS, List AF. Efficacy and safety of lenalidomide in patients with myelodysplastic syndrome with chromosome 5q deletion. *Ther Adv Hematol* 2012; 3(2): 105-16.