

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2015.05.012

川芎嗪对急性髓性白血病 KG-1a 细胞表面标志物的影响*

张宇¹ 田劭丹¹ 侯丽^{1,2} 许亚梅¹ 陈信义^{1,2△}

(1 北京中医药大学东直门医院 北京 100700; 2 中医内科学北京市重点实验室 北京 100700)

摘要 目的:探讨川芎嗪对急性髓性白血病 KG-1a 细胞表面标志物的影响。方法:通过体外细胞培养技术,利用中药有效成分单体干预细胞生长,运用 MTT 法及流式细胞术检测了经川芎嗪干预后的 KG-1a 细胞表面标志物 CD34、CD33、CD123 与 CD7、CD56、CD44 表达。结果:川芎嗪干预 KG-1a 细胞 48 小时后,细胞表面标志物 CD34⁺CD33⁺、CD34⁺CD123⁺、CD33⁺CD123⁺ 表达率较对照组明显减少($P < 0.05$),但是对于 CD34⁺ 表达率无明显作用,同时,川芎嗪干预 KG-1a 细胞 48 小时后,KG-1a 细胞表面标志物 CD7、CD56、CD44 荧光强度与对照组比较明显降低($P < 0.05$),但是对 KG-1a 细胞表面标志物 CD7、CD56、CD44 表达率无明显影响,与对照组比较无统计学意义($P > 0.05$)。结论:川芎嗪逆转白血病耐药作用,除能够降低 MDR、P-gp 高表达外,能够降低白血病干细胞特异性表面标志物 CD34⁺CD123⁺、CD34⁺CD33⁺、CD33⁺CD123⁺、CD7、CD56、CD44 表达水平,从白血病干细胞水平逆转多药耐药。

关键词: 川芎嗪; KG-1a 细胞系; 分子标志物

中图分类号: R557 **文献标识码:** A **文章编号:** 1673-6273(2015)05-844-05

Impact of TMP on Acute Myeloid Leukemia KG-1a Cell Surface Markers*

ZHANG Yu¹, TIAN Shao-dan¹, HOU Li^{1,2}, XU Ya-mei¹, CHEN Xin-yi^{1,2△}

(1 Dongzhimen Hospital of Beijing University of Chinese Medicine, Beijing, 100700, China;

2 Key Laboratory for Internal Medicine of Chinese Medical Science of Beijing, Beijing, 100700, China)

ABSTRACT Objective: To study the TMP on acute myelogenous leukemia KG-1a cell surface markers. **Methods:** By in vitro cell culture techniques, using flow cytometry, the cell surface markers of CD34, CD33 and CD123 CD7, CD56, and CD44 expressions were examined after the TMP intervention of KG - 1a cell. **Results:** TMP had no effect on the CD34⁺ expression, and reduced the levels of expressions CD34⁺CD123⁺, CD34⁺CD33⁺, and CD33⁺CD123⁺ in KG-1a cells ($P < 0.05$). Meanwhile, TMP also decreased the fluorescence intensity of CD7, CD56, and CD44 ($P < 0.05$). **Conclusion:** TMP can reverse leukemia drug resistance, and reduce the expression of LSC surface markers including CD34⁺CD123⁺, CD34⁺CD33⁺, CD33⁺CD123⁺, CD7, CD56, and CD44.

Key words: TMP; KG-1a cell line; Molecular markers

Chinese Library Classification(CLC): R557 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2015)05-844-05

前言

川芎嗪属于酰胺类生物碱,化学结构为四甲基吡嗪(teramethylpyrazine, TMP),是一种新型钙通道阻滞剂,具有轻度抑制肿瘤细胞生长,并在非细胞毒剂量下不仅能有效地增加化疗药物对肿瘤细胞的杀伤活性,而且还能逆转急性白血病的多药耐药性^[1]。但 TMP 逆转白血病多药耐药是否在白血病干细胞(leukemia stem cells, LSC)水平发挥效应很少文献报道。因此,我们以高表达 CD34⁺的急性髓系白血病细胞系 KG-1a 为靶细胞,通过体外细胞培养技术,运用流式细胞术检测经 TMP 干预后的 KG-1a 细胞表面标志物 CD34、CD33、CD123、CD7、CD56、CD44 表达,拟探究 TMP 在 LSC 水平逆转白血病耐药机制。

1 材料与方法

1.1 细胞系

KG-1a 细胞购于中国医学科学院血液病研究所,细胞接种于含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养液中,置 37℃、5% CO₂ 和全湿条件下培养,取对数生长期细胞用于实验。

1.2 药物

盐酸川芎嗪(批号:817-200104)购于中国食品药品检定研究院, RPMI1640 培养液溶解配制为 1 mg/mL 母液,过滤除菌, -20℃ 保存。

1.3 试剂

RPMI1640 培养基和胎牛血清,为美国 Gibco 公司产品;鼠抗人 CD34-FITC、鼠抗人 CD38-APC、鼠抗人 CD33-PECy5、鼠抗人 CD123-PE、鼠抗人 CD96-PE、鼠抗人 CD117-PE、鼠 IgG1K-Isotype-Control-FITC、鼠 IgG1K-Isotype Control-PE、鼠 IgG1 K -Isotype Control PE-Cy5、鼠 IgG1 K-Isotype Con

* 基金项目:教育部高等学校博士点专项基金(20100013110008);北京市教委共建科研基地项目(2012年北京中医药大学)

作者简介:张宇,博士研究生,研究方向:白血病中西医结合防治, E-mail: zhangyu1441@sina.com

△ 通讯作者:陈信义,教授,电话:84017637, E-mail: chenxinyi0729@126.com

(收稿日期:2014-10-28 接受日期:2014-11-25)

trol-APC, 均为美国 eBioscience 公司产品。MTT 和 DMSO 为 Amersco 公司产品。

1.4 仪器

北京昌平长城空气净化设备工程公司生产的超净工作台; 倒置相差显微镜(日本 OLYMPUS MIT-2);CO₂ 培养箱(日本 SANYO L-74-17);酶标仪(Clinicbio 128C)。流式细胞仪(美国 BD 公司)。

1.5 药物配制

MTT 粉末用 PBS 配制成浓度为 5 mg/mL 工作液,过滤除菌于 4℃ 保存。TMP 使用 RPMI1640 培养液溶解配制为 1 mg/mL 储存液,过滤除菌,-20℃ 保存。

1.6 细胞培养

人急性髓细胞性白血病细胞系 KG-1a, 用内含 10% 灭活胎牛血清的 RPMI1640 培养基培养,细胞接种密度为 2×10^6 个/mL,置于 37℃,5% CO₂ 温箱中培养,3 天换液一次。

1.7 MTT 试验

将 KG-1a 细胞 (3×10^5 个/mL) 接种于 96 孔培养板(Costar)中,每孔加细胞悬液 100 μ L,实验组以倍比稀释的方法由高到低分别加入 500 μ g/mL、100 μ g/mL、50 μ g/mL、5 μ g/mL、0.5 μ g/mL 5 个浓度的 TMP 溶液,每组设 3 个复孔;对照组加入等体积培养基。培养 24 h、48 h 和 72 h,采用常规 MTT 法检测^[2]。每孔加 MTT(5 mg/mL) 20 μ L,孵育 4 h 后,离心 96 孔板,吸出上清,每孔加 DMSO 150 μ L,振荡 10 min,使结晶物充分溶解,用酶标仪(波长 492 nm)测定各孔吸光度 OD 值,计算细胞抑制率。细胞抑制率(%)=(1- 实验组 OD 值 / 对照组

OD 值)× 100 %。

1.8 FCM 检测细胞表面标志物

取对数生长期的细胞,离心,将 KG-1a 细胞 (3×10^5 个/mL)接种于 6 孔培养板(Costar)中,每孔加细胞悬液 1 mL,实验组使用 MTT 法检测出川芎嗪 IC50 药物浓度干预细胞,对照组加入等体积培养基,每孔终体积 2 mL,48 h 后收集细胞,用 PBS 洗 2 次,100 μ L PBS 重悬细胞,制成单细胞悬液 (1×10^6 个/L),1 组分别加入鼠抗人 CD34-FITC、鼠抗人 CD38-APC、鼠抗人 CD123-PE;2 组分别加入鼠抗人 CD34-FITC、鼠抗人 CD123-PE、鼠抗人 CD33-PECy5;3 组分别加入鼠抗人 CD34-FITC、鼠抗人 CD38-APC、鼠抗人 CD96-PE;4 组加鼠抗人 CD-117PE;室温避光孵育 30 分钟,后 PBS 洗涤两遍,流式细胞仪检测。同型对照分别为鼠抗人 IgG1-PECy5、鼠抗人 IgG1-PE、鼠抗人 IgG1-APC,鼠抗人 IgG1-FITC,同时设置阴性对照。检测采用 FSC(forward scatter,FSC)/侧向角(side scatter,SSC)双参数散点图框定 KG-1a 细胞位置(设门),再对门内细胞进行荧光抗体分析。实验重复 3 次。

1.9 统计学方法

采用 SPSS17.0 对数据进行分析,数据采用均数± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。主要采用 t 检验和相关回归分析分析数据。当 P<0.05 时,被认为有统计学意义。

2 结果

2.1 TMP 对细胞增殖抑制影响

TMP 对 KG-1a 细胞增殖抑制作用结果见表 1。

表 1 TMP 对 KG-1a 细胞增殖抑制作用($\bar{x} \pm s$,%)

Table 1 Inhibition of TMP on the proliferation of KG - 1a cells ($\bar{x} \pm s$,%)

Concentration of TMP (μ g/mL)	n	24 h		48 h	
		OD	Inhibition rate (%)	OD	Inhibition rate (%)
Control group	3	0.366± 0.043		0.612± 0.019	
0.5	3	0.350± 0.042	4.3± 1.3	0.570± 0.043	6.90± 4.90
1	3	0.331± 0.036	9.5± 3.6	0.541± 0.018*	11.5± 0.40
5	3	0.315± 0.037	13.9± 0.5	0.418± 0.070 [△]	31.8± 10.1
10	3	0.286± 0.029*	21.8± 4.5	0.353± 0.009 [△]	42.2± 3.2
500	3	0.251± 0.161*	31.2± 3.9	0.265± 0.015 [△]	56.7± 1.5

Note: Compared with the control group,*P<0.05;△P<0.01.

从表 1 可以看出,TMP 作用于 KG-1a 细胞 24 h,10 μ g/mL、500 μ g/mL 药物组 OD 值与对照组比较明显减少,有统计学意义(P<0.05);48 小时时间段,除 0.5 μ g/mL 药物组外,各药物组 OD 值与对照组相比,均明显低于对照组(P<0.05);且随着药物浓度增高,TMP 对 KG-1a 细胞 OD 值下降、抑制率

增加。表明 TMP 对 KG-1a 细胞增殖抑制作用具有时间和药物浓度依赖性。

2.2 TMP 对 CD34、CD33、CD123 表达影响

流式细胞术检测 CD34、CD33、CD123 结果见表 2,图 1。

表 2 CD34、CD33、CD123 表达结果($\bar{x} \pm s$,%)

Table 2 Expression of CD34,CD33,CD123($\bar{x} \pm s$,%)

Markers	n	Control group(%)	Experimental group(%)
CD34 ⁺	3	96.05± 2.76	91.95± 5.16
CD34 ⁺ CD123 ⁺	3	61.4± 2.55	47.85± 2.90*
CD34 ⁺ CD33 ⁺	3	69.93± 6.51	57.13± 1.20*
CD33 ⁺ CD123 ⁺	3	50.13± 3.85	36.97± 0.38*

Note: Compared with the control group,*P<0.05.

从表 2 可以看出,川芎嗪干预 KG-1a 细胞 48 小时后,CD34⁺CD33⁺、CD34⁺CD123⁺、CD33⁺CD123⁺ 表达率明显下降,与对照组比较,有统计学意义(P<0.05)。

2.3 TMP 对 CD44、CD7、CD56 表达影响
流式细胞术检测 CD7、CD56、CD44 表达结果见表 3,图 2。

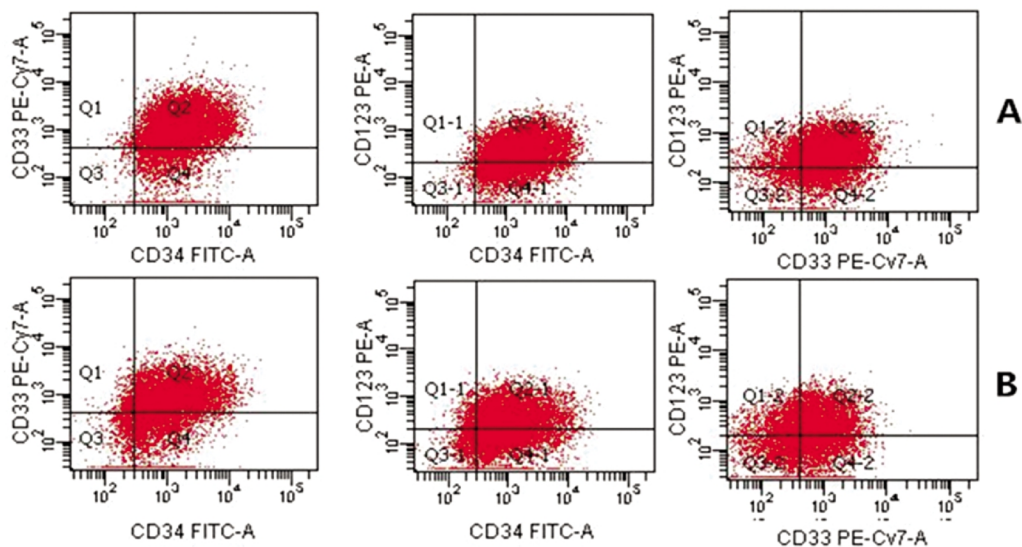


图 1 川芎嗪对 KG-1a 细胞表面标志物 CD34、CD123、CD33 表达的影响

Fig.1 Effect of TMP on KG-1a cell surface markers expression of CD34,CD123,CD33

Note: A: the control group; B: the experimental group.

表 3 CD7、CD56、CD44 表达结果($\bar{x} \pm s, \%$)

Table 3 The expression of CD7, CD56, CD44($\bar{x} \pm s, \%$)

Markers	Control group		Experimental groups	
	Fluorescence intensity	Expression rate(%)	Fluorescence intensity	Expression rate(%)
CD7	4048 $\pm$ 319.77	93.97 $\pm$ 1.80	2885.67 $\pm$ 211.88*	80.67 $\pm$ 6.79
CD56	12649.5 $\pm$ 60.10	93.10 $\pm$ 5.60	7946.50 $\pm$ 1102.38*	92.65 $\pm$ 4.03
CD44	20361.67 $\pm$ 1281	97.85 $\pm$ 0.64	17735.33 $\pm$ 95.48*	97.15 $\pm$ 0.21

Note: Compared with the control group, *P<0.05.

从表 3 可以看出,川芎嗪干预 KG-1a 细胞 48 小时后,CD7、CD56、CD44 荧光强度与对照组比较明显减小,差异均有

统计学意义(P<0.05);但是对 CD7、CD56、CD44 表达率无明显影响,与对照组比较无统计意义(P>0.05)。

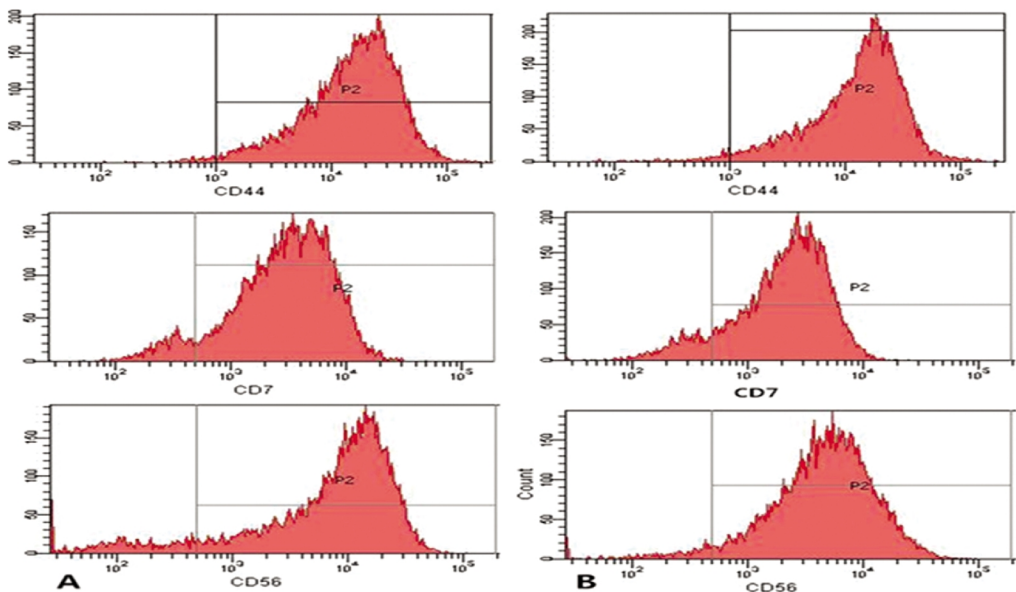


图 2 川芎嗪对 KG-1a 细胞 CD44、CD7、CD56 表达的影响

Fig. 2 Effect of TMP on KG-1a CD44,CD7,CD56 expression

Note: A:control group; B:experimental group.

3 讨论

Bonnet 等将从急性髓细胞白血病 (acute myelocytic leukemia, AML) 患者中离出的 CD34⁺/CD38⁻ 表型的白血病细胞亚群移植给非肥胖糖尿病 / 重症联合免疫缺陷小鼠 (nonobesediabetic/severe combined immune deficient mice, NOD/SCID) 后, NOD/SCID 小鼠发生了 AML, 在二次移植给 NOD/SCID 小鼠, 依然能够看到同样结果, 表明这群细胞具有干细胞样强大的自我更新、分化和无限增殖能力, 并认为此群细胞为 LSC^[3]。Rhenen 等发现, AML 患者 LSC 的数量与预后有关, 高 LSC 的 AML 患者与体内残留病灶密切相关, 且能逃避化疗药物杀伤作用^[4]。目前, 标准的常规化疗方案对处于 G₀ 期的 LSC 几乎起不到杀伤效果, 一旦化疗失败, 有 95 % 以上处于 G₀ 期静止状态的 LSC 很少进行分裂增殖。LSC 对 5- 氟尿嘧啶、甲氨蝶呤和阿糖胞苷等抗代谢药极不敏感, 且易对多种化疗药物产生交叉耐药^[5]。分子生物学研究表明, LSC 除具有正常造血干细胞 (hemopoietic stem cell, HSC) 相同的表型标记, 如 CD34⁺、CD38⁻、HLA-DR⁻、CD71⁺、CD133⁺、CD117⁺ 等外, 还具有其自身特异性的细胞表型^[6], 如 CD123、CD33、CD56、CD7 等高表达。其中, 有些特异性表面分子标志物高表达与 AML 复发与难治存在着明显的相关性。有研究提示, CD123、CD33 均是 LSC 和 HSC 鉴别的重要分化抗原, CD33 仅在近 2/3 的 AML 患者 LSC 上表达, 可能是潜在的单克隆抗体治疗靶点之一^[7-9]。曹晖等研究发现, CD7 和 CD56 在 AML 患者的异常表达发生在 AML 细胞分化的早期阶段, 治疗后 CD34⁺CD38⁻Lin⁻ 干细胞中 CD7⁺ 和 CD56⁺ 细胞比例高的患者易出现 MRD, 表明疾病进展和预后不良^[10]。动态监测 CD7、CD56 表达, 对发现 AML 早期复发有重要意义。CD44 在 LSC 和 HSC 均高表达, 尤其在 AML-LSC 中普遍表达具有重要意义^[11,12]。

TMP 是活血化痰中药川芎的主要化学成分。对心血管系统、中枢神经系统等具有广泛的药效作用。近年发现, TMP 对多种肿瘤细胞具有一定抑制作用^[13-15], 同时具有弱的钙离子拮抗作用的特点, 可以下调多药耐药性 (multidrug resistance, MDR) 基因表达, 减少细胞膜表面 P- 糖蛋白 (P-glycoprotein, P-gp) 表达水平, 具有逆转肿瘤多药耐药活性^[16-18]。但国内文献对 TMP 逆转肿瘤耐药研究多集中在下调 MDR、P-gp 高表达, 而对具有增殖潜能, 且有天然耐药特性的 LSC 及其分子标志物进行研究的文献很少。

基于上述, 我们在既往研究基础上, 选取了具有 LSC 特征的人急性髓系白血病细胞系 KG-1a 作为研究对象, 采用流式细胞仪检测了 KG-1a 细胞在体外孵育下, 经 TMP 干预后的细胞表面特异性分子标志物 CD34⁺CD123⁺、CD34⁺CD33⁺ 及 CD33⁺CD123⁺ 表达。研究结果发现, TMP 对于 CD34⁺ 表达阳性细胞无明显作用, 而能够降低 KG-1a 细胞 CD34⁺CD123⁺、CD34⁺CD33⁺、CD33⁺CD123⁺ 表达水平。同时, 我们的研究还发现, TMP 与化疗药物配合应用时, CD7、CD56、CD44 的荧光强度均有所下降。由此可见, TMP 逆转白血病耐药, 除能够降低 MDR、P-gp 高表达外^[19,20], 对 LSC 也有一定的抑制作用。这一研究结果为 TMP 逆转耐药作用靶点提供了重要依据, 也为 TMP 配合化疗治疗急性白血病与难治白血病提供了更广阔的研究

思路。关于 TMP 作用于 LSC 的蛋白基因与信号通路调控我们正在深入研究。

参考文献 (References)

- [1] 赵永辰, 陈信义, 许亚梅, 等. 川芎嗪逆转急性白血病多药耐药性初步临床研究[J]. 中国中医药信息杂志, 2003, 10(12): 10-12
Zhao Yong-chen, Chen Xin-yi, Xu Ya-mei, et al. Principal Clinical Study on Ligustrazine Injection to Counteract the Multi-drug Resistance of Acute Leukemia[J]. Chinese Journal of Information on Traditional Chinese Medicine, 2003, 10(12): 10-12
- [2] Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays[J]. Immunol Methods, 1983, 65: 55-63
- [3] Bonnet D, Dick JE. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell [J]. Nat Med, 1997, 3(7): 730-737
- [4] Rhenen A, Feller N, Kelder A, et al. High stem cell frequency in acute myeloid leukemia at diagnosis predicts high minimal residual disease and poor survival[J]. Clin Cancer Res, 2005, 11(18): 6520-6527
- [5] Levis M, Murphy KM, Pham R, et al. Internal tandem duplications of the FLT3 gene are present in leukemia stem cells[J]. Blood, 2005, 106(2): 673-680
- [6] Guan Y, Gephart B, Hogge DE. Detection, isolation, and stimulation of quiescent primitive leukemic progenitor cells from patients with acute myeloid leukemia (AML)[J]. Blood, 2003, 101(8): 3142-3149
- [7] Chávez-González A, Dorantes-Acosta E, Moreno-Lorenzana D, et al. Expression of CD90, CD96, CD117, and CD123 on different hematopoietic cell populations from pediatric patients with acute myeloid leukemia[J]. Arch Med Res, 2014, 45(4): 343-350
- [8] Leyton JV, Williams B, Gao C, et al. MicroSPECT/CT imaging of primary human AML engrafted into the bone marrow and spleen of NOD/SCID mice using 111In-DTPA-NLS-CSL360 radioimmunoconjugates recognizing the CD123+/CD131- epitope expressed by leukemia stem cells[J]. Leuk Res, 2014, [Epub ahead of print]
- [9] Miura R, Yoshimi M, Kikuchi Y, et al. Myeloid/natural killer cell precursor acute leukemia diagnosed by cell marker analysis [J]. Rinsho Ketsueki, 2013, 54(6): 579-583
- [10] 曹晖, 王亚哲, 吴红红, 等. CD7 和 (或) CD56 阳性急性髓系白血病患者干细胞表型分析及在微量残留病检测中的意义[J]. 中华血液学杂志, 2008, 1(29): 23-28
Cao Hui, Wang Ya-zhe, Wu Hong-hong, et al. The immunophenotypic analysis of CD7 and (or) CD56 acute myeloid leukemic stem cells and its application in minimal residual disease detection[J]. Chin J Hematol, 2008, 1(29): 23-28
- [11] Charrad RS, Gadhoun Z, Qi J, et al. Effects of anti -CD44 monoclonal antibodies on differentiation and apoptosis of human myeloid leukemia cell line[J]. Blood, 2002, 99(1): 290-299
- [12] Jin L, Hope KJ, Zhai Q, et al. Targeting of CD44 eradicates human acute myeloid leukemic stem cells [J]. Nat Med, 2006, 12(10): 1167-1174
- [13] 韩娇艳, 朱方强, 徐祥, 等. 川芎嗪通过 Akt 信号通路影响前列腺癌 PC3 细胞的增殖和凋亡[J]. 第三军医大学学报, 2013, 35(2): 105-108
Han Jiao-yan, Zhu Fang-qiang, Xu Xiang, et al. Tetramethylpyrazine hydrochloride inhibits proliferation and apoptosis in human prostate

- cancer PC3 cells through Akt signaling pathway [J]. Journal of Third Military Medical University, 2013, 35(2): 105-108
- [14] 王鹏龙,徐昕,李国梁,等.新型川芎嗪衍生物的合成及其抗癌活性研究[J].西北药学杂志,2014,29(1):58-64
Wang Peng-long, Xu Xin, Li Guo-liang, et al. Synthesis and anti-tumor activity evaluation of new ligustrazine derivatives [J]. Northwest Pharmaceutical Journal, 2014, 29(1):58-64
- [15] Yin J,Yu C,Yang Z,et al.Tetramethylpyrazine inhibits migration of SKOV3 human ovarian carcinoma cells and decreases the expression of interleukin-8 via the ERK1/2, p38 and AP-1 signaling pathways[J]. Oncol Rep, 2011, 26(3):671-679
- [16] 侯常,潘雪珂,陈朝,等.川芎嗪对人宫颈癌 HeLa 细胞增殖的影响及其分子机制[J].新医学,2013,44(1):61-64
Hou Chang, Pan Xue-ke, Chen Chao, et al. Effects of tetramethylpyrazine on human cervical carcinoma cell line HeLa and its mechanisms [J]. New Medicine, 2013,44(1):61-64
- [17] 刘明华,任美萍,李蓉,等.川芎嗪对人卵巢癌顺铂耐药细胞株 COC1/DDP 的逆转作用研究[J].重庆医学,2011,40(20):1982-1984
Liu Ming-hua, Ren Mei-ping, Li Rong, et al. Reversal effect of tetramethylpyrazine on cisplatin-resistant ovarian cancer cell line COC1/DDP[J]. ChongQing Medicine, 2011,40(20):1982-1984
- [18] 陆永高,孙倩茹,张明,等.川芎嗪对耐阿霉素肝癌细胞的增效作用[J].中国中西医结合消化杂志,2013,21(6):290-293
Lu Yong-gao, Sun Qian-ru, Zhang Ming, et al. Intensifying action of tetramethylpyrazine on ADR-resisitent hepatocellular carcinoma cells [J]. Chinese Journal of Integrated Traditional and Western Medicine on Digestion, 2013,21(6):290-293
- [19] Wang XB, Wang SS, Zhang QF, et al. Nhhibition of tetramethylpyrazine on P-gp, MRP2, MRP3 and MRP5 in multidrug resistant human hepatocellular carcinoma cells[J]. Oncol Rep, 2010,23(1):211-215
- [20] 王听,陈信义,牛福玲,等.川芎嗪干预白血病及脐带血细胞 P-糖蛋白表达初步研究[J].中国医药学报,2002,17(12):729-730
Wang Ting, Chen Xin-yi, Niu Fu-lin, et al. Preliminary study of ligustrazine intervention leukemia and umbilical cord blood cells P-glycoprotein expression [J]. China Journal of Traditional Chinese Medicine and Pharmacy, 2002,17(12):729-730

(上接第 817 页)

- [16] Dandri M, Lutgehetmann M, Volz T, et al. Small animal model systems for studying hepatitis B virus replication and pathogenesis[J]. Seminars in liver disease, 2006, 26(2): 181-191
- [17] Walter E, Keist R, Niederost B, et al. Hepatitis B virus infection of tupaia hepatocytes in vitro and in vivo [J]. Hepatology, 1996, 24(1): 1-5
- [18] 李军,刘宏利,韩超,等.病毒接种剂量对 HBV 感染成年树鼯的影响[J].免疫学杂志,2012,28(12): 1056-1060
Li Jun, Liu Hong-li, Han Chao, et al. Impact of viral inoculum dose on the outcome of HBV infection in adult Tupaia [J]. Immunological Journal, 2012, 28(12): 1056-1060
- [19] Njouom R, Mba SA, Nerrienet E, et al. Detection and characterization of hepatitis B virus strains from wild-caught gorillas and chimpanzees in Cameroon, Central Africa [J]. Infect Genet Evo, 2010, 10(6): 790-796
- [20] Lyons S, Sharp C, LeBreton M, et al. Species association of hepatitis B virus (HBV) in non-human apes; evidence for recombination between gorilla and chimpanzee variants [J]. PloS one, 2012, 7(3): e33430
- [21] 龙隽,刘杰波,张绍芳,等. siRNA 对乙型肝炎孕鼠及胎鼠体内的抗乙型肝炎病毒的保护作用探讨 [J]. 临床合理用药杂志, 2012, 5(19): 44-46
Long Juan, Liu Jie-bo, Zhang Shao-fang, et al. Discussion of protective effect of anti-hepatitis B virus of siRNA on pregnancy mouse and fetal mouse with infected Hepatitis B virus [J]. ChinJof Clinical Rational DrugUse, 2012, 5(19): 44-46
- [22] Kapoor NR, Kumar V. Hepatitis B Virus: A Molecular Perspective [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences, 2012, 82(1): 31-41