

广东地区 HPV16 型 L1 基因的序列分析及其 毕赤酵母表达载体的构建

刘红¹, 宇丽¹, 周羽竝¹, 莫宏波¹, 刘萍²,
李发涛¹, 李冬艳¹, 罗京资¹

(1. 暨南大学医学院生物化学教研室, 广东广州 510632; 2. 番禺妇幼保健院, 广东广州 511400)

[摘要] 目的: 分析广东地区人乳头瘤病毒(HPV)16 型 L1 基因结构特点; 构建广东分离株 HPV16 L1 毕赤酵母分泌型表达载体。方法: 采用 PCR 技术从广东地区宫颈癌组织中扩增 HPV16 L1 基因, 克隆入毕赤酵母表达载体 pPICZαC, 测序并对 HPV16 L1 基因进行序列分析。结果: 成功扩增了广东地区 HPV16 L1 基因, 并构建了其毕赤酵母表达载体 pPICZαC-HPV16 L1。广东分离株 HPV16 L1 基因序列与德国标准株相比有 16 处不同, 同源性为 98.99%, 其编码的氨基酸序列有 8 处发生改变; 与中国标准株比较有 9 处不同, 同源性为 99.18%, 其编码的氨基酸序列有 4 处发生变化; 发现在 HPV16 L1 基因序列中 nt5 649、nt5 652、nt5 654、nt5 657、nt5 692、nt5 693, 6 个位点存在突变。结论: 广东地区 HPV16 L1 基因序列与德国标准株、中国标准株相比较均存在差异; 成功构建广东地区 HPV16 L1 真核表达载体。

[关键词] 人乳头瘤病毒 16 型; 广东; L1 基因; 突变; 毕赤酵母

[中图分类号] R373 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1000-9965(2008)02-0115-06

Sequence analysis of human papillomavirus 16 L1 gene from Guangdong area and construction of its pichia pastories expression vector

LIU Hong¹, YU Li¹, ZHOU Yu-bing¹, MO Hong-bo¹, LIU Ping², LI Fa-tao¹,
LI Dong-yan¹, LUO Jing-zi¹

(1. Department of Biochemistry, Medical College, Jinan University, Guangzhou 510632, China;

2. Panyu Maternal and Children Health Hospital, Guangzhou 511400, China)

[Abstract] **Aim:** To investigate the structure specificity of human papilloma virus (HPV) type 16 in Guangdong area, and to construct its pichia pastories secretion type expression vector. **Methods:** The HPV16 L1 gene were amplified from human cervical carcinoma tissues in Guangdong province by PCR, and cloned into pichia pastories expression vector. The HPV16 L1 gene were sequenced and analyzed. **Results:** The HPV16 L1 gene sequence were obtained, and the HPV16 L1 pichia pastories expression vector were constructed. There were 16 nucleotide differences between Guangdong strain and Germanic standard strain, the sequences were 98.99% homology, subsequently changed 8 amino acids it coded. There were 9 nucleotide differences between Guangdong strain and Chinese standard strain, the sequences were 99.18% homology, subsequently changed 4 amino acids it coded. There are 6 mutations

[收稿日期] 2007-12-17

[基金项目] 教育部科学技术研究重点项目资助(重点 02190); 广东省卫生厅医学科研基金资助项目资助(A2001305)

[作者简介] 刘红(1981-), 女, 硕士研究生. 研究方向: 分子生物学. 通讯作者: 宇丽, Tel: 020-85220256; E-mail: doctoryuli@yahoo.com

(nt5 649, nt5 652, nt5 654, nt5 657, nt5 692, nt5 693) in HPV16 L1 gene sequence obtained from Guangdong area. **Conclusion:** There are nucleotide differences of HPV16 L1 gene among Germanic standard strain, Chinese standard strain and Guangdong strain. Guangdong HPV16 L1 pichia pastories expression vector were constructed.

[Key words] human papilloma virus (HPV) type 16; Guangdong; L1 gene; mutation; pichia pastories

人乳头瘤病毒(human papilloma virus, HPV)为乳多空病毒科多瘤病毒亚科的一种双链环状DNA病毒,是一种嗜上皮性病毒,具有高度的宿主特异性。目前已分离鉴定出120多种,根据其致病力的不同分为高危型、中危型和低危型3类。有资料表明,宫颈癌的发生率在妇女生殖道肿瘤中占首位,其危害性仅次于乳腺癌,已成为危害妇女健康的第二杀手^[1]。流行病学调查和临床实验研究结果均已证实,高危型HPV感染与宫颈癌的发生密切相关,其中高危型HPV16是引发子宫颈癌的最主要因素,占有感染比例的50%以上。在我国每年宫颈癌新发病例约13.15万,占世界宫颈癌新发病总数的28.8%^[2]。鉴于宫颈癌发病的主要原因已明确,而保护机体免受HPV感染可以有效地预防宫颈癌的发生,故HPV疫苗的研究已成为各国科研工作者所关注的一个热点。

2006年美国食品与药品管理局(FDA)正式批准美国默克公司生产的预防性宫颈癌疫苗Gardasil上市,此疫苗是针对其本国国民所感染人乳头瘤状病毒研制,而HPV病毒存在地域变异性。变异株病毒感染,尤其HPV16变异株感染,被认为较原型感染发生宫颈上皮内瘤变和浸润性宫颈癌的风险会增大^[3]。研究针对本地区的HPV流行株的疫苗很有必要,本实验的研究结果为本地区预防性宫颈癌疫苗的开发提供了基础。

1 材料和方法

1.1 材料

(1)组织来源 10例宫颈癌组织均取自2006年11月-2007年1月暨南大学第一附属医院和番禺妇幼保健院(何贤纪念医院)妇科住院手术患者。10例患者年龄38~69岁,平均年龄47岁。患者均为广东籍,出生并长期生活在广东,均否认长期外地居住史。所取组织均经病理学确诊,取手术切除的病变组织,投入液氮速冻。

(2)质粒与宿主菌 pPICZαC,大肠杆菌菌株

TOP10F,和酵母菌株GS115均购自invitrogen公司。

(3)试剂 蛋白酶K, RNase 购自 invitrogen 公司;Pfu DNA 聚合酶为天根公司产品;PCR产物纯化试剂盒与质粒提取试剂盒为Omega公司产品;限制性内切酶 *Cla* I, *Xba* I, *Sac* I 与 T₄ 连接酶购自 promega 公司。酵母提取物、胰蛋白胨、蛋白胨、生物素和山梨醇均购于华美生物技术公司;Zeocin 为 invitrogen 公司产品;其他试剂为分析纯以上试剂。

1.2 方法

(1)癌组织DNA提取 参考文献[4]方法提取。

(2)引物设计 根据 GenBank 发表的 HPV16 L1(序列号 NC-001526)跨 HPV16 L1 完整编码基因,设计 HPV16 L1 基因上下游引物;并在上、下游引物5'端分别引入 *Cla* I 及 *Xba* I 酶切位点(下划线标出),外加保护碱基,由上海生工合成。

上游引物:HPV16 L1 5' ccatcgcagtcgactttatttatacctcctag 3'

下游引物:HPV16 L1 5' gctctagagccacttagccagcgcagcttacg 3'。

(3)目的基因 HPV16 L1 的扩增与纯化 以广东地区宫颈癌组织提取的DNA为模板,HPV16 L1 上下游引物进行PCR反应。反应参数:95℃ 5 min, 94℃ 30 s, 55℃ 1 min, 72℃ 2 min, 共30个循环,末次循环后72℃延伸10 min。扩增产物经1%凝胶电泳检测,将目的条带切下后,用DNA回收试剂盒回收纯化。送交上海生工公司测序,以 HPV16 L1 基因上下游引物为测序引物,中间段测序引物由上海生工公司设计并合成。

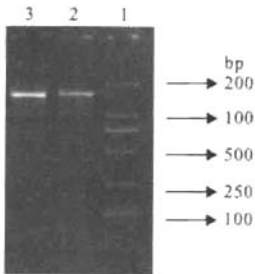
(4)真核表达载体的构建与鉴定 将纯化的 HPV16 L1 片段与 pPICZαC 载体同时用限制性内切酶 *Cla* I 及 *Xba* I 进行酶切,HPV16 L1 基因与载体按照 Omega 公司 DNA 回收试剂盒操作,回收后 T₄ 连接酶连接。将连接产物转化入 TOP10F,感受态细胞,在低盐 LB, Zeocin 抗性培养基中筛选培养。挑取阳性克隆,培养后小量提取质粒,采用 *Cla* I 及 *Xba* I 双位点单、双酶切鉴定。选取阳性克隆,交上海

生工公司测序,测序引物为 5'AOX1 和 3'AOX1,中间段测序引物由上海生工公司设计并合成。

(5) HPV16 L1 基因序列的分析 采用 DNAMAN version5.2.2 软件分别对德国标准株、中国标准株和广东分离株 HPV16 L1 基因序列进行同源性比较、HPV16 L1 蛋白疏水性预测及 HPV16 L1 蛋白抗原决定簇预测结果进行对比分析。

2 结果

(1) 采用 HPV16 L1 基因的特异性引物,以广东地区宫颈癌组织提取的 DNA 为模板扩增 HPV16 L1 片段,10 份标本中 NO. 3 与 NO. 5 两份标本为 HPV16 L1 阳性。PCR 产物 1% 琼脂糖凝胶电泳结果,可见长约 1 600 bp 左右的扩增条带,其大小与预期相符,见图 1。



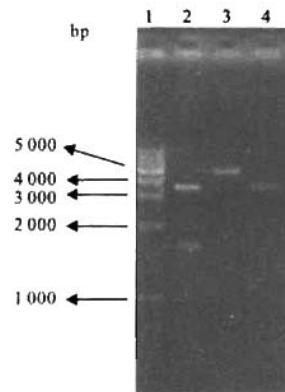
1: DL 2 000 DNA Marker; 2: NO. 3 标本 HPV16L1 基因 PCR 产物; 3: NO. 5 标本 HPV16L1 基因 PCR 产物

图1 HPV16 L1 基因 PCR 产物的电泳分析

(2) 回收 HPV16 L1 片段与 pPICZαC 载体连接,获得重组表达质粒 pPICZαC-HPV16L1,经 *Cla* I 及 *Xba* I 双酶切鉴定在 1 600 及 3 500 bp 处各见一条清晰条带与预计片段大小一致,经 *Cla* I 单酶切鉴定在 5 100 bp 处见一条清晰条带,见图 2。

(3) 本实验从广东地区所分离获得的 2 个 HPV16 L1 核苷酸基因序列基本一致。测序结果与 Seedorf 等^[5]于 1985 年报道的德国标准株,谷鸿喜等^[6]于 1999 年报道的中国株 HPV16 L1 基因序列进行比较,发现广东分离株 HPV16 L1 基因序列与德国标准株相比有 16 处不同,同源性为 98.99%,其编码的氨基酸序列有 8 处发生改变;与中国标准株比较有 9 处不同,同源性为 99.18%,其编码的氨基酸序列有 4 处发生变化(见表 1),即在 HPV 全基因组序列中,nt5 649 处的 C 变为 G,核苷酸三联密码由 CTG→GTG,其编码的第 31 位氨基酸由亮氨酸变为缬氨酸;nt5 652 与 nt5 654 处 C 变为 A, T 变为 C,核苷酸三联密码 CCT→ACC,其编码的 32 位氨

基酸由脯氨酸→苏氨酸;nt5 657 位的 T 变为 A,核苷酸三联密码 AGT→AGA,其编码的 33 位氨基酸由丝氨酸→精氨酸;nt5 692 与 nt5 693 处的核苷酸 C 变成 T, T 变成 A,核苷酸三联密码 TCT→TTA,其编码的 45 位氨基酸由丝氨酸变成亮氨酸;nt6 240 位的 C 变成 G,核苷酸三联密码 CAT→GAT,其编码的 228 位氨基酸由组氨酸→天冬氨酸;nt6 432 位的 A 变成 G,核苷酸三联密码 ACT→GCT,其编码的 292 位氨基酸由苏氨酸变成丙氨酸;nt6 731 位 A 变成 G,此处突变为同义突变,其编码的氨基酸序列未发生改变;nt6 901 与 nt6 902 间插入 3 个核苷酸 CAT, A⁶⁹⁰C⁶⁹²C→A⁶⁹⁰CAT C⁶⁹²C→ACA TCC,氨基酸序列相应位置插入一个丝氨酸;原始序列 nt6 952 ~ nt6 954 编码天门冬氨酸的 GAT 缺失并导致氨基酸序列相应位置的天门冬氨酸缺失;nt7 061 处的 G 变成 A,该处突变为同义突变其编码的氨基酸序列并未发生变化。



1: 1 kb DNA Marker; 2: pPICZαC-HPV16 L1 *Cla* I 与 *Xba* I 双酶切结果(3 500 bp 1 600 bp); 3: pPICZαC-HPV16 L1 *Cla* I (5 100 bp) 单酶切结果; 4: pPICZαC *Cla* I 酶切结果(3 500 bp)

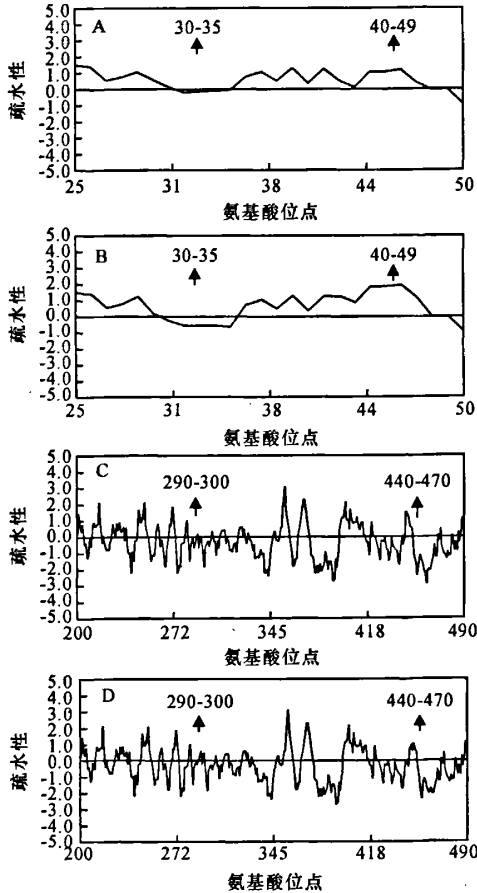
图2 重组质粒 pPICZαC-HPV16 L1 酶切鉴定结果

(4) 采用 DNAMAN version5.2.2 软件对广东地区 HPV16 L1 分离株与德国标准株的蛋白质理化性质预测结果进行对比分析。广东分离株 HPV16 L1 蛋白质氨基酸残基 30 到 35 位氨基酸区域较德国标准株同位置疏水性减弱;广东分离株氨基酸残基 40 ~ 49 位氨基酸区域较德国标准株疏水性增强(图 3A,图 3B)。广东分离株 HPV16 L1 蛋白质氨基酸残基 290 到 300 位氨基酸区域较德国标准株同位置疏水性增强,而蛋白质氨基酸残基 440 到 470 位氨基酸区域则较德国标准株同位置疏水性减弱(图 3C,3D)。

表 1 广东分离株 HPV16 L1 与德国标准株及中国标准株核苷酸序列的比较¹⁾

核苷酸位置	核苷酸的改变			密码子的改变		氨基酸的改变	
	德国标准株	中国标准株	广东分离株	德国标准株	广东分离株	德国标准株	广东分离株
5 649	C	C	G	CTG	GTG	L ³¹	V ³¹
5 652	C	C	A	CCT	ACC	P ³²	T ³²
5 654	T	T	C	CCT	ACC	P ³²	T ³²
5 657	T	T	A	AGT	AGA	S ³³	R ³³
5 692	C	C	T	TCT	TTA	S ⁴⁵	L ⁴⁵
5 693	T	T	A	TCT	TTA	S ⁴⁵	L ⁴⁵
6 240	C	G	G	CAT	GAT	H ²²⁸	D ²²⁸
6 432	A	A	G	ACT	GCT	T ²⁹²	A ²⁹²
6 731	A	G	G	CGA	CGG	R ³²⁹	R ³²⁹
6 901-6 902	***	~CAT	~CAT	***	TCC	***	~S ⁴⁴⁹
6 952-6 954	GAT	***	***	GAT	***	D ⁴⁶⁶	***
7 061	G	G	A	AGG	AAA	K ⁴⁹¹	K ⁴⁹¹

1) ~表示插入; *** 表示不存在核苷酸或氨基酸; 上标表示氨基酸位置



A:德国标准株第 25 位至第 50 位氨基酸 HPV16 L1 蛋白疏水性预测结果;B:广东分离株第 25 位至第 50 位氨基酸 HPV16 L1 蛋白疏水性预测结果;C:德国标准株第 200 位至第 490 位氨基酸 HPV16 L1 蛋白疏水性预测结果;D:广东分离株第 200 位至第 490 位氨基酸 HPV16 L1 蛋白疏水性预测结果

图 3 HPV16 L1 蛋白疏水性预测分析

抗原决定簇分析结果显示(见表 2),在德国标准株蛋白中有 19 个可能抗原决定簇,在广东分离株中有 20 个可能的抗原决定簇。德国标准株中 25-FQMSLWLPSEATVYLPPVPVSKV VSTDEYVARTNIYYHA-63 这一抗原决定簇得分为 1.220,由 39 个氨基酸残基组成。在分离株中这个 39 个氨基酸残基组成的抗原决定簇变成两个,分别为 25-FQMSLWVT-32(8 个氨基酸残基构成)和 34-EATVYLPVVPVLKVSTDEYVARTNIYYHA-63(30 个氨基酸残基构成),得分分别为 1.067 和 1.254;在德国标准株中 443-TYRFVTQAIACQKHTPP-459 肽段抗原决定簇评分为 1.143;广东分离株 L1 蛋白在第 448 氨基酸残基后插入一个丝氨酸,相应抗原决定簇肽段 443-TYRFVTSQAIACQKHTPP-460 得分为 1.106。除此两处差别以外,广东分离株与德国标准株其余的抗原决定簇相同。

表 2 德国标准株与广东分离株抗原决定簇预测结果比较

病毒株	抗原决定簇预测数	预测抗原决定簇的氨基酸序列	抗原决定簇评分
德国标准株	19	25-FQMSLWLPSEATVYLPPVPVSKV VSTDEYVARTNIYYHA-63	1.220
		443-TYRFVTQAIACQKHTPP-459	1.143
广东分离株	20	25-FQMSLWVT-32	1.067
		34-EATVYLPVVPVLKVSTDEYVARTNIYYHA-63	1.254
		443-TYRFVTSQAIACQKHTPP-460	1.106

3 讨论

1949 年 Straus 等^[7]首先在电镜下从普通疣体

浸出液中观察到病毒颗粒,HPV 颗粒呈球形,其二十面体对称,直径约 45~55 nm;HPV 的分子长度约 7.8~8 kb;HPV 基因组按功能分 2 个编码区,其间有 0.4~1.0 kb 的非编码片段分隔;E(早期)编码区有早期基因 E1~E7,包含病毒复制和细胞转化必需的信息;L(晚期)编码区含晚期基因 L1 和 L2,仅在分化的角化细胞中表达,编码病毒颗粒的结构蛋白^[8]。HPV L1 为人乳头瘤状病毒的主要衣壳蛋白,具有自我组装成病毒样颗粒(virus-like particle, VLP)的特性。病毒样颗粒能刺激机体产生高滴度的中和抗体^[9],其结构与天然完整病毒的构型十分相似,易被巨噬细胞摄取。在树突状细胞中通过 cross-presentation 与 MHC-I 类分子(MHC class I molecule)结合呈递抗原决定簇,引起 CTL(cytotoxic T lymphocytes)反应^[10],且病毒样颗粒不含病毒基因组 DNA,在宿主细胞中不能复制,没有感染性。HPV L1 的特性使其成为一个理想的预防性疫苗的靶抗原。

实验中为了最大限度的减少 PCR 反应中产生的碱基错配,采用了 pfu DNA 聚合酶,pfu 酶具有 3'→5'外切酶的活性,可以提高 PCR 反应扩增的准确率。

根据实验测序结果与相关文献资料,发现 HPV16 全基因序列 nt6 240 位由 C 变成 G,为一突变热点^[11],由于该位点碱基的突变导致三联体密码的改变使其编码的氨基酸由组氨酸变成天冬氨酸,此改变可使 L1 自我组装为病毒样颗粒的效率大大提高,可能与其变异株的高致病性相关。HPV 是专性细胞内复制的胞内微生物^[12],病毒通过 L1 蛋白与基底化细胞表面的 HPV 受体结合、感染细胞^[13]。在早期,HPV 基因组于基底细胞层内以多拷贝(少于 20~50 拷贝)核外附体的形式与细胞 S 期同步复制合成,E1、E2 两种磷酸化核蛋白调控病毒 DNA 的复制和低水平转录,而 E6、E7 和 E5 蛋白诱导宿主细胞发生增殖性病变。后期随着角质形成细胞的分化和向表层移行,早期基因的转录与翻译明显增加,同时分化依赖性地激活 E4、L1、L2 基因的转录和翻译,并完成核内病毒颗粒成功组装^[14]。HPV16 L1 的组装效率的提高可使病毒颗粒组装效率增加,大量新合成的 HPV 由被感染的复层鳞状上皮的表层脱屑角化细胞释放,继续感染邻近的细胞,使

机体患病的机会显著增加,但作用机制仍需进一步研究。

比对分析广东分离株与德国标准株的基因序列发现,广东分离株在 nt6 240、nt6 432 发生突变,在 nt6 901 与 nt6 902 间插入 3 个核苷酸 CAT, nt6 952-nt6 954 处 GAT 缺失。HPV16 L1 是一段高度保守的基因序列,而以上 4 处突变,在中国均有报道^[5,15],推测 HPV16 L1 位点的基因突变可能是进化选择的,可能为 HPV16 种系进化的一个中间环节;由于这些位点的改变导致其编码的氨基酸也发生变化,结果显示,广东分离株 HPV16 L1 蛋白相关位置的疏水性发生改变,对分离株抗原表位造成一定程度的影响。本实验结果显示分离株抗原决定簇的抗原性较德国标准株减弱,可能是病毒逃避自然免疫识别,导致宫颈癌发生的一个环节。

与中国标准株和德国标准株的基因序列相比较,广东分离株在 nt5 649、nt5 652、nt5 654、nt5 657、nt5 692、nt5 693,这 6 处碱基也发生了突变,突变使 L1 蛋白相关位置肽段的疏水性发生改变。抗原决定簇分析结果显示,广东分离株 HPV16 L1 中,由于 LPS 突变为 VTR,25-FQMSLWVT-32 肽段的抗原性较弱,34-EATVYLPPVPVLKV VSTDEYVARTNIYY-HA-63 肽段的抗原性比标准株肽段的抗原性要增强,可能会导致 L1 蛋白的抗原决定簇的构象发生改变,使病毒逃脱免疫监视从而导致机体致病。以上 6 处碱基的改变未见报道,是 HPV16 进化发展的一个阶段,抑或偶发的点突变?是否仅在广东地区存在,具有区域性?有待进一步研究。

HPV16 L1 成为宫颈癌预防性疫苗的理想的选择靶蛋白,与其独特的具有自我组装成病毒样颗粒的生物学特性密切相关的,HPV16 L1 蛋白只有正确的折叠为类病毒样颗粒才具生物学活性,必须选择一个合适的表达系统。毕赤酵母是近十年来发展起来的极具潜力的一种真核表达系统,其生物产品的安全性已经得到美国 FDA 的认可。毕赤酵母表达系统对于表达重组蛋白具有独特的优越性。

综上所述,广东分离株 HPV16 L1 基因的成功克隆,为 HPV16 型预防性疫苗的研制提供了基础。

[参考文献]

- [1] HAUSEN H Z. Cervical carcinoma and human papilloma-

- virus on the road to preventing a major human cancer[J]. *Nat Cancer Inst*, 2001, 93(4): 252 - 253.
- [2] PARKIN D M, DRAY F, FERLAY J, et al. Estimating the world cancer burden: Globocan 2000[J]. *Int J Cancer*, 2001, 94(2): 153 - 156.
- [3] ICENOGIE J P, SATHYA P, MILLER D L, et al. Nucleotide and amino acid sequence variation in the L1 and E7 open reading frames of human papillomavirus type 6 and type 16 [J]. *Virology*, 1991, 184(1): 101 - 107.
- [4] 萨姆布鲁克 J, 弗里奇 E F, 曼尼阿蒂斯 T, 等. 分子克隆实验指南[M]. 第2版. 北京: 科学出版社, 1992: 463 - 469.
- [5] SEEDORF K, KRAEMER G, DUERST M, et al. Human papillomavirus type 16 DNA sequence[J]. *Virology*, 1985, 145(1): 181 - 185.
- [6] 谷鸿喜, 凌虹, 张凤民, 等. 宫颈癌组织中人乳头瘤病毒 16 型 L1 基因的克隆及序列分析[J]. *中华实验和临床病毒学杂志*, 1999, 13(1): 17 - 19.
- [7] 侯云德. 分子病毒学[M]. 北京: 学苑出版社, 1990, 183.
- [8] LAIMINS L A. Regulation of transcription and replication by human papillomavirus[M] // MCCANCE D J. *Human Tumor Viruses*. Washington: ASM press, 1998: 201 - 205.
- [9] 张学军, 刘维达, 秦建中. 现代皮肤性病进展[M]. 合肥: 安徽科学技术出版社, 1997: 163.
- [10] PAIKER T J, MONTERO J M, MARTIN M M, et al. Antibody, cytokine and cytotoxic T lymphocyte responses in chimpanzees immunized with human papillomavirus virus like particles[J]. *Vaccine*, 2001, 19(27): 3733 - 3743.
- [11] 安静, 余黎, 席亮民, 等. 人乳头瘤病毒 16 型 L1 蛋白的克隆及表达[J]. *微生物学免疫学进展*, 2007, 35(1): 26 - 29.
- [12] 林学颜, 张玲. 现代细胞与分子免疫学[M]. 北京: 科学出版社, 1999: 334.
- [13] 黄婴, 吴令英. 人乳头瘤病毒变异株与宫颈疾病[J]. *癌症进展杂志*, 2006, 4(2): 136 - 142.
- [14] 陈连凤, 王森. 乳头瘤病毒感染的免疫学特性[J]. *中国免疫学杂志*, 2003, 19(9): 659 - 662.
- [15] 马正海, 张富春, 梅新娣, 等. 新疆南部地区维吾尔族妇女宫颈组织中乳头状瘤病毒 16 型 L1 基因突变谱分析[J]. *中华医学杂志*, 2004, 84(12): 987 - 991.

[责任编辑: 李弘, 朱颖嫒]

(上接第 109 页)

- [4] CROMPTON M. The mitochondrial permeability transition pore and its role in cell death [J]. *Biochem. J*, 1999, 341(2): 233 - 249.
- [5] 梁佩燕, 曾耀英, 王通, 等. p38 对放线菌酮经线粒体途径诱导 HL-60 细胞死亡的影响 [J]. *中华血液学杂志*, 2006, 27(6): 398 - 402.
- [6] FADEEL B. Plasma membrane alterations during apoptosis: role in corpse clearance [J]. *Antioxid Redox Signal*, 2004, 6(2): 269 - 275.
- [7] NUSBAUM P, LAINE C, SEVEAU S, et al. Early membrane events in polymorphonuclear cell (PMN) apoptosis: membrane blebbing and vesicle release, CD43 and CD16 down-regulation and phosphatidylserine externalization[J]. *Biochem Soc Trans*, 2004, 32(3): 477 - 479.
- [8] SEBBACH M, RENVOIZE C, HAMELIN J, et al. Caspase-3-mediated cleavage of ROCK I induces MLC phosphorylation and apoptotic membrane blebbing [J]. *Nat Cell Biol*, 2001, 3(4): 346 - 352.
- [9] KROEMER G, DALLAPORTA B, RESCHERIGON M. The mitochondrial death/life regulator in apoptosis and necrosis[J]. *Annu Rev Physiol*, 1998, 60: 619 - 642.

[责任编辑: 李弘, 朱颖嫒]