

Shkbp1 缺失对小鼠 T 淋巴细胞系亚群的影响

刘 擎, 张潇涵, 仰明明, 周泽启, 王丽京, 李江超

(广东药科大学 基础学院血管生物学研究所, 广州 510006)

【摘要】 目的 探讨 Shkbp1 缺失小鼠(Shkbp1^{-/-})的血液、骨髓、脾脏中血液细胞分类和 T 细胞亚群的变化。方法 采用 Shkbp1^{-/-}转基因小鼠,经 PCR 鉴定基因型;利用全自动血液检测仪测定血液细胞分类;采用流式细胞仪检测 Shkbp1^{-/-}和对照组小鼠血液、骨髓、和脾脏中 T 淋巴细胞亚群。结果 血常规结果:中性粒细胞和嗜酸性粒细胞有增高趋势,且有显著差异。淋巴细胞未见显著差异。流式结果显示:对照组血液中 CD4⁺CD8⁺ 双阳性细胞降低,骨髓中 CD3⁺、CD4⁺ 升高。但脾脏组织中,其 CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺、CD4⁺CD8⁺ 双阳性细胞均呈下降趋势。**结论** Shkbp1 参与血液细胞的成熟分化,影响了免疫细胞数量,本研究为探索 Shkbp1 如何参与血液细胞的分化奠定了研究基础。

【关键词】 Shkbp1; T 细胞亚群;CD3⁺;CD4⁺;CD8⁺;基因工程小鼠

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2017) 04-0056-07

doi: 10. 3969. j. issn. 1671 - 7856. 2017. 04. 010

Effects of Shkbp1 deletion on mouse T lymphocyte subsets

LIU Qing, ZHANG Xiao-han, YANG Ming-ming, ZHOU Ze-qi, WANG Li-jing, LI Jiang-chao

(Guangdong Pharmaceutical University, School of Basic Courses, the Vascular Biology Institute, Guangzhou 510006, China)

【Abstract】 Objective Shkbp is also called Shkbp1, can competitively inhibit binding Cln85 and c-Cbl, thereby blocking the epidermal growth factor receptor (EGFR) endocytosis and degradation, to play a role in tumor promotion. This study aims to explore the changes in blood cell classification and T cell subsets in blood, bone marrow, and spleen in Shkbp1-deletion (Shkbp1^{-/-}) mice. **Methods** Shkbp1^{-/-} transgenic mice were identified by PCR genotyping. Blood cell classification was performed using an automatic classification system. Flow cytometry was used to detect the T lymphocyte subsets in the blood, bone marrow, and spleen of Shkbp1^{-/-} and control mice. **Results** Routine blood examination showed that neutrophils and eosinophils tended to increase and showing significant differences, and there was no significant difference in lymphocytes. The flow cytometry results showed that there was a decrease of CD4⁺CD8⁺ double positive cells and increase of bone marrow CD3⁺ and CD4⁺ cells in the control group. However, there was a decreasing trend of CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺, and CD4⁺CD8⁺ cells in the spleen tissues. **Conclusions** Shkbp1 is involved in the maturation and differentiation of blood cells, and affects the number of immune cells. This study lays a foundation for the study of how Shkbp1 is involved in the differentiation of blood cells.

【Key words】 Shkbp1; Leukocytes; T cell subsets; CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺, CD4⁺CD8⁺ lymphocytes; Genetically engineered mice

[基金项目] 国家自然科学基金(No. 81472336 和 No. 31471290)和广东省科技计划(2015A030302086 和 2014A020212313) 共同资助。

[作者简介] 刘擎(1992 -),女,研究生,专业:病理学与病理生理学。Email:liuqing6620@163.com。

[通讯作者] 李江超(1976 -),男,副研究员,研究方向:肿瘤微环境。Email:lijiangchao1234@163.com。

Shkbp1 基因于 2008 年通过酵母双杂交的方法被筛选出来^[1],研究表明 Shkbp1 蛋白存在两个富含脯氨酸(PXXXPR)的结构域第 618 ~ 623 位氨基酸残基(PSPSPR)和第 679 - 684 位氨基酸残基(PTRApR)参与 CIN85 的 SH3 保守结构域结合^[2,3]。Shkbp1 可以竞争抑制 CIN85 和 c-Cbl 的结合,从而阻断表皮生长因子受体(EGFR)的内吞和降解。Cbl 是一种泛素化激酶,有 c-Cbl, Cbl-b 和 Cbl-3 三个成员组成。c-Cbl 它能够与酪氨酸激酶和受体酪氨酸激酶结合并被磷酸化,磷酸化后的 c-Cbl 泛素化激酶活性被激活,使其结合的酪氨酸激酶和受体酪氨酸激酶多聚泛素化降解^[4]。

一般情况下,受体活化并传递信号后就会从细胞表面脱落,以避免信号持续活化对有机体产生伤害。当受体酪氨酸激酶活化后的负调控被阻断或者扰乱后,细胞功能异常,人体就会产生恶性肿瘤等疾病^[5]。EGF(表皮生长因子)和 EGFR 结合,二聚化后自身磷酸化的 EGFR 与 c-cbl(泛素化激酶)通过 SH2 保守结构域结合并使之磷酸化,激活泛素酶活性使 EGFR 一部分降解^[6-8]。其次,Shkbp1 被报道与遗传疾病相关,还有报道其与卵巢癌^[9]和白血病^[10]相关。

Shkbp1 参与血细胞起源、增殖、分化和发育成熟的过程。血细胞在造血器官或组织中产生,发育成熟或接近成熟时才释放到血液中,但是该基因的缺失是否能引起小鼠血液细胞分化和免疫细胞的改变,并未见报道。本研究针对 Shkbp1 基因缺失小鼠,检测其免疫功能的变化,为深入了解 Shkbp1 提供了理论基础,为了解 Shkbp1 对免疫的影响提供了动物水平的模型。本文针对免疫功能检测血常规及流式等一系列实验,旨在探讨该基因缺失条件下的小鼠免疫功能的变化。

1 材料和方法

1.1 实验动物及实验环境

Shkbp1 敲除小鼠,简称 Shkbp^{-/-}小鼠,以 C57BL/6 背景,是耿建国教授(密歇根大学)馈赠^[11],由本实验室何晓东老师饲养保种,并且开展了一些早期实验,其结果已经发表^[12]。于广东省医学实验动物中心(生产许可证号 SCXK(粤)2008-0002)购买 C57BL/6 小鼠。以上实验用鼠均自由饲养在 SPF 环境条件,使用许可证号改为【SYXK(粤)2012-0125】。室内温度维持在(24 ± 2)℃之间,湿

度保持在 40% ~ 60%,噪声小于 60 db。

小鼠饲养和鉴定:所有小鼠均于 SPF 级环境下饲养,将 Shkbp-1^{+/-}雄鼠和 Shkbp-1^{+/-}雌鼠杂交,得到的子代有三种情况 Shkbp-1^{+/-}、Shkbp-1^{+/+}、Shkbp-1^{-/-},经鉴定后得到实验鼠 Shkbp^{-/-}小鼠和对照鼠 Shkbp-1^{+/+}。Shkbp-1 小鼠鉴定引物序列为:P1:5'-CTAAATCACTCCAAAGGATCC-3';P2:5'-TACCGGTGGATGTGGAATGT-3';P3:5'-CTAAATCACTCCAAAGGATCCC-3';P4:5'-ATTCATGCATTCTCCTTTGGCA-3'。PCR 反应条件为:95℃ 5 min 预变性,94℃ 30 s 变性,58℃ 30 s 退火 40 个循环;72℃ 45 s 延伸,72℃ 2 min 充分延伸,4℃ 冷却扩增产物。P1 和 P2 是鉴定突变型条带,扩增条带为 307 bp,P3 和 P4 是鉴定野生型条带,扩增条带为 483 bp。在配置好的 1.2% 琼脂糖凝胶中,利用 TAE 电泳缓冲液进行电泳设定条件:165 V,30 min。再将凝胶放置在凝胶成像系统里,电脑成像系统里观察 PCR 的电泳结果^[13]。

1.2 仪器与试剂

PCR 引物购自 Life 上海分公司,PCR Mix 购自美国 Thermo Fisher 公司;EDTA·K₂ 抗凝管采集血样;利用全自动五分类血液分析仪进行检测分析,其型号 XT-2000i, Sysmex, 日本;检测时,设置小鼠血样程序进行检测。流式细胞仪型号为:BD FACSCanto™ II, 流式细胞术检测抗体:CD3-FITC(11-0032), CD4-PE(12-0041), CD8e-PerCP-Cyanine 5.5(45-0081)以上抗体均购自 eBioscience 公司。

1.3 血常规检测

取 8 周龄的 Shkbp-1^{-/-}, C57 小鼠各 6 只,乙醚麻醉约 1 min,眼眶取血 200 μL 到 1 mL 的 EDTA·K₂ 抗凝管中,上机前 4℃ 放置。

1.4 血液 CD3、CD4、CD8 细胞检测

取 8 周龄的 Shkbp-1^{-/-}, C57 小鼠各 6 只,眼眶取血到 1 mL 的 EDTA·K₂ 抗凝管中,抽取 50 μL,加入 CD3、CD4、CD8 抗体避光孵育 30 min,用红细胞裂解液裂解 15 min,1500 r/min,离心 5 min;弃上清液,用 0.5% BSA 1 mL 细胞重悬,1 500 r/min,离心 5 min,弃上清液;重复 1 次,取 200 μL 混匀,上机检测^[14]。

1.5 脾脏 CD3、CD4、CD8 细胞检测

以上小鼠摘除脾脏,用 0.5% BSA 在 0.22 mm 尼龙筛网研磨过滤,取筛网下的液体 50 μL,加入

CD3、CD4、CD8 抗体避光孵育 30 min,用红细胞裂解液裂解 10 min,1 500 r/min,离心 5 min;弃上清液,用 0.5% BSA 1 mL 细胞重悬,1 500 r/min,离心 5 min,弃上清;重复 1 次,取 200 μ L 混匀,上机检测。

1.6 骨髓 CD3、CD4、CD8 细胞检测

将以上小鼠后腿取下,抽提骨髓,同上述分离单细胞,进行流式实验检测。

1.7 统计学方法

实验涉及的数据统计方法:采用 M 依 SD 或中位数表示,利用 Gradprim 5.0 软件,采用 *t* 检验,假设条件 $P < 0.05$ 具有统计意义。

2 结果

2.1 Shkbp-1^{-/-}小鼠基因型鉴定

Shkbp1 敲除小鼠构建是敲除了 Shkbp1 基因的 1-6 个外显子而获得的(图 1A)。将 Shkbp-1^{+/-}雄鼠和 Shkbp-1^{+/-}雌鼠杂交,得到的子代有三种情况 Shkbp-1^{+/-}、Shkbp-1^{+/+}、Shkbp-1^{-/-},经鉴定后得到实验鼠 Shkbp-1^{-/-}小鼠和对照鼠 Shkbp-1^{+/+}。其中野生条带在 483 bp 处,突变条带在 307 bp 处(图 1B)。

2.2 Shkbp-1^{-/-}小鼠血常规检测变化

通过全自动五分类血液分析仪分析血液,设置小鼠血液分类检测程序。检测正常生理条件 8 周龄的 Shkbp-1^{-/-}小鼠与同周龄的 C57 对比,白细胞总数无明显差异(图 2A)。在白细胞分类中,Shkbp-1^{-/-}小鼠与 C57 相比,淋巴细胞绝对计数有降低趋势,但无显著差异(图 2B);单核细胞绝对计数,两组之间无差异(图 2C)。但是,Shkbp-1^{-/-}小鼠与 C57 相比,中性粒细胞和嗜酸性粒细胞有增高趋势(图 2D-图 2E),并且有显著差异($P < 0.05$)。

2.3 Shkbp-1^{-/-}小鼠外周血中 CD4⁺CD8⁺双阳性细胞数目降低

T 细胞是重要的免疫细胞,CD3⁺抗体标记的是 T 淋巴细胞,它是胸腺依赖淋巴细胞,其具有多种重要的免疫功能。不同的免疫功能与其细胞膜上的分化抗原(CD)的种类相关联,其中 CD4 和 CD8 是关键的分化抗原。为探究它是否发生变化,我们利用流式检测 CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺细胞亚群的变化,结果发现,将 C57 小鼠和 Shkbp-1^{-/-}小鼠的外周血进行红细胞裂解,而后标记 CD3、CD4、CD8 抗体,用流式细胞技术进行检测^[15,16]。将 CD3 阳性细胞进

行设区域设门(图 3A 和 3B)。检测结果显示实验组小鼠 CD4⁺CD8⁺双阳性细胞绝对计数和百分比都有下降趋势,与正常小鼠对比(图 3E~图 3F),差异明显($P < 0.05$)^[17,18]。CD4⁺、CD8⁺细胞绝对计数及百分比无统计学差异,所以数据未展示。

2.4 Shkbp-1^{-/-}小鼠骨髓中 CD3⁺、CD4⁺细胞绝对计数升高

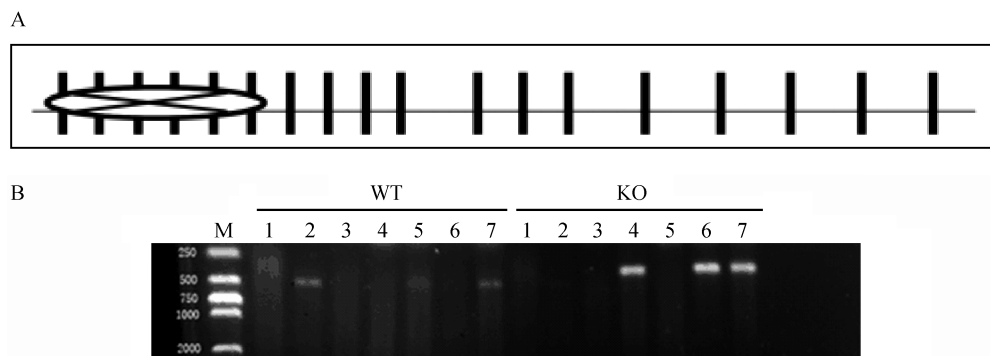
骨髓是免疫器官中枢免疫器官之一。主要作用为造血及 B 细胞分化发育提供场所,为再次体液免疫应答发生提供场所^[19]。同样,制备单细胞悬液后,进行流式检测,将 CD3 阳性细胞进行设区域设门(图 4A~图 4B),流式检测 CD4 和 CD8 细胞(图 4C~图 4D)。检测结果显示实验组小鼠 CD3 细胞绝对计数和百分比都有上升趋势,与正常小鼠对比(图 4E~图 4F),差异明显($P < 0.05$)。实验组小鼠 CD4 细胞绝对计数也有上升趋势(图 4G),差异明显($P < 0.05$)。

2.5 Shkbp-1^{-/-}小鼠脾脏中 CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺、CD4⁺CD8⁺双阳性细胞均显著减少

脾脏是机体最大的免疫器官,占全身淋巴组织总量的 25%,含有大量的淋巴细胞和巨噬细胞,是机体细胞免疫和体液免疫的中心^[20,21]。通过制备单细胞悬液,进行流式检测,将 CD3 阳性细胞进行设区域设门(图 5A~图 5B),流式检测 CD4 和 CD8 细胞代表图(图 5C 和图 5D)。结果提示:Shkbp^{-/-}小鼠脾脏中 CD3⁺绝对计数降低(图 5E),并且有显著差异($P < 0.001$);CD4⁺绝对计数降低(图 5F),有显著差异($P < 0.01$);CD8⁺绝对计数降低(图 5G),有显著差异($P < 0.001$)。并且 CD4⁺CD8⁺双阳性细胞也降低(图 5H),差异显著($P < 0.001$)。

3 讨论

Shkbp1 是调控 EGFR 降解相关的分子,我们的研究表明 Shkbp 基因小鼠免疫细胞和血液细胞出现异常。本研究结果显示,骨髓中 CD3⁺、CD4⁺细胞数目升高,对照组血液中 CD4⁺CD8⁺双阳性细胞数目降低,并且在脾脏组织中,流式结果显示其 CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺、CD4⁺CD8⁺双阳性细胞数目均呈下降趋势。(如图 6)脾脏为最大的免疫器官,淋巴细胞数量丰富。一般来说,T 细胞一旦成熟,就随血流离开胸腺进入外周免疫器官或外周血。但是,我们发现 Shkbp1 敲除小鼠的脾脏中各种免疫细胞均显著降低,提示 Shkbp1 在血液细胞的分化成熟调



注:A; Shkbp-1^{-/-}小鼠的构建,我们的小鼠为敲除了前六个外显子构建的;B; Shkbp-1^{-/-}小鼠的鉴定,2号为 Shkbp-1^{+/+}基因型小鼠,4号为 Shkbp-1^{-/-}基因型小鼠,7号为 Shkbp-1^{+/-}基因型小鼠。

图1 Shkbp-1^{-/-}小鼠的构建与鉴定

Note. A; Construction of the Shkbp1 knockout mice, obtained by knocking out the 1-6 exons of the Shkbp1 gene; B; Identification of Shkbp-1^{-/-} mouse. No. 2 is of Shkbp-1^{+/+} genotype mouse, No. 4 is of Shkbp-1^{-/-} mouse genotype, No. 7 is of Shkbp-1^{+/-} genotype mouse.

Fig.1 Construction and identification of the Shkbp-1^{-/-} mice

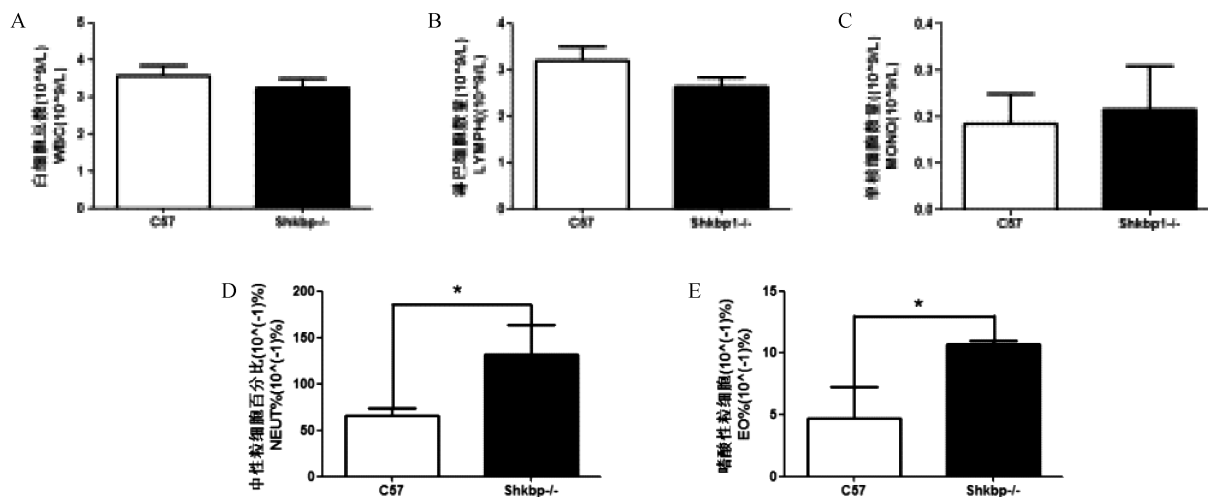


图2 全自动血液细胞分类仪检测小鼠血液中白细胞分类变化

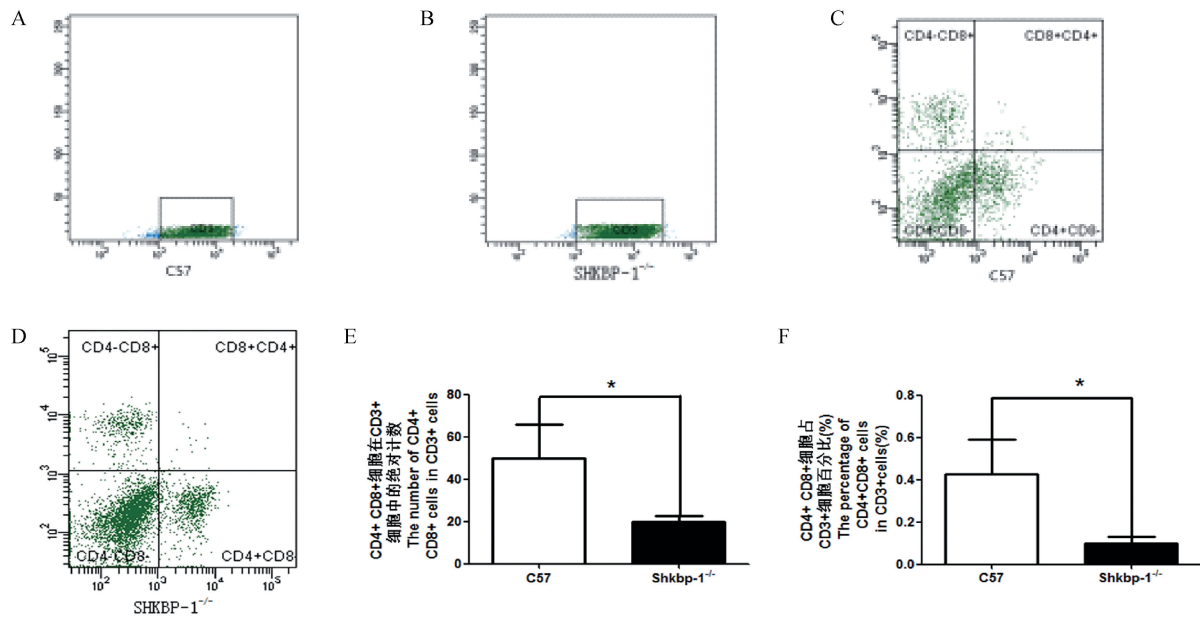
Fig.2 Changes of leukocyte classification in the blood of mice detected with an automatic blood cell sorter. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

控中有重要作用。

在本研究中,我们采用的是专门设置检测小鼠血液的仪器程序来检测血常规,摒弃了原来用临床检测小鼠血常规的不足。但是,同我们以前的结果相比,对照组 C57 小鼠白细胞总数相差 5.5×10^9 个/L 左右,淋巴细胞数量相差 1.5×10^9 个/L 左右,单核细胞数量相差 0.8×10^9 个/L 左右。其原因可能是:(1)在季节上,存在冬夏两个季节气温的差异。(2)在来源问题上,本实验所用的 C57 小鼠为广东省实验动物中心购买后于本实验室动物房饲养繁殖使用,以前所用的 C57 小鼠于广东省实验动物中心购买后直接使用。其原因有待进一步深入检测和了解,我们一直在关注该问题。

另外,还利用流式细胞仪检测细胞亚群。此次研究取材于 8 周大小的 Shkbp^{-/-} 小鼠及对照组 C57 小鼠,对照组及实验组各取材 6 只。取其外周血进行流式测定,研究结果显示:实验组 CD4⁺CD8⁺ 双阳性细胞数目降低,目前关于这一概念的相关报道较少。近年来,越来越多的证据表明:人类和其他动物外周血中存在少量 CD4⁺CD8⁺ 双阳性 T 细胞,并具有独特的免疫活性。至于为什么实验组 CD4⁺CD8⁺ 双阳性细胞数目降低,目前尚不清楚,仍需做进一步研究。

胚胎时期的脾脏曾一度为造血器官,可产生各种血细胞。出生后脾脏在异常情况下可髓外造血,但脾脏仍能制造淋巴细胞等与免疫相关系的细胞

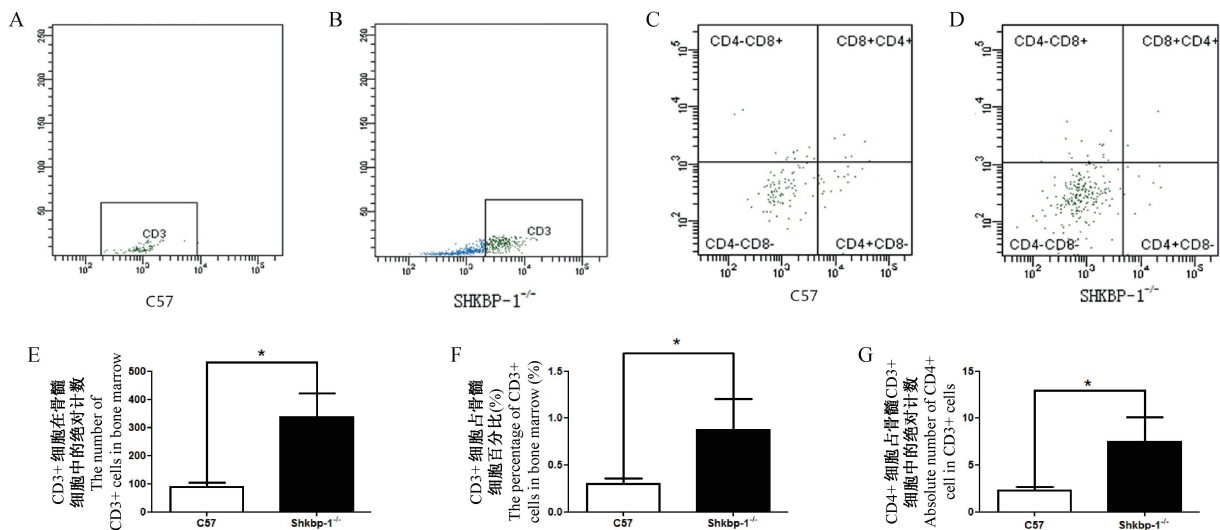


注:A, B: 流式检测 C57 小鼠和 Shkbp-1^{-/-} 小鼠血液中 CD3⁺ 淋巴细胞的区域设门; C、D: 流式检测 CD4 和 CD8 细胞; E: CD4⁺ CD8⁺ 双阳性细胞在 CD3⁺ 细胞中的绝对计数; F: CD4⁺ CD8⁺ 双阳性细胞占 CD3⁺ 细胞的百分比; * $p < 0.05$

图 3 Shkbp-1^{-/-} 小鼠血液中 CD4⁺ CD8⁺ 双阳性细胞降低

Note. A, B: The gated area of CD3⁺ lymphocytes in the blood of C57 mice and shkbp-1^{-/-} mice. C, D: CD4 and CD8 cells detected with flow cytometry; E: The absolute number of CD4⁺ CD8⁺ double-positive cells in CD3⁺ cells; F: Percentage of CD4⁺ CD8⁺ double positive cells in CD3⁺ cells. * $P < 0.05$.

Fig. 3 Count of CD4⁺ CD8⁺ double-positive cells is decreased in the blood of Shkbp-1^{-/-} mice



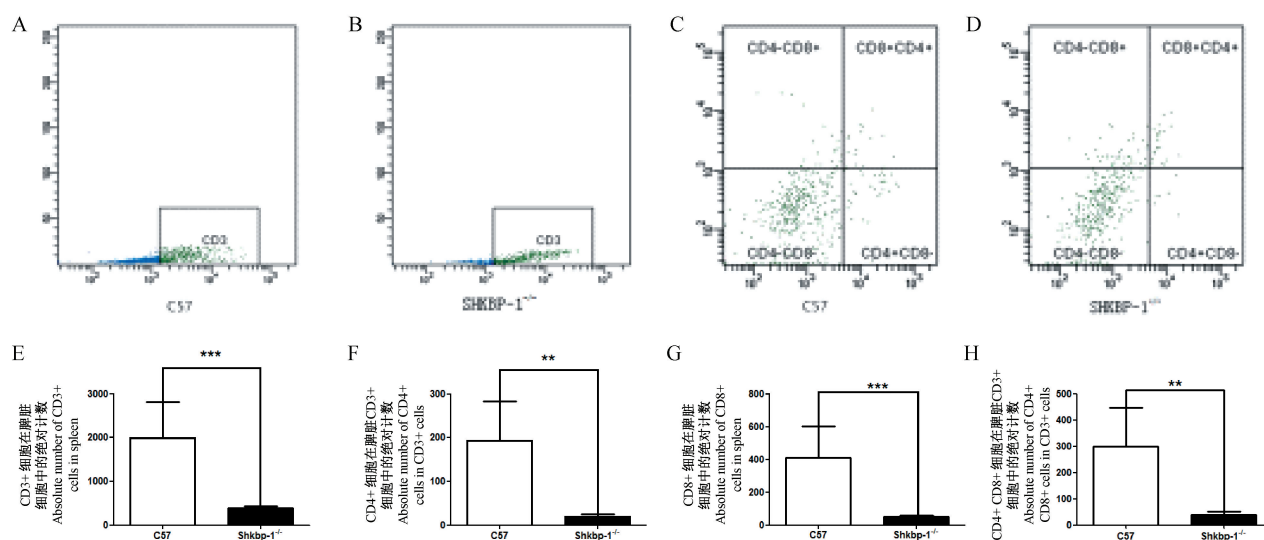
注:A、B: 流式检测 C57 小鼠和 Shkbp-1^{-/-} 小鼠骨髓中 CD3⁺ 淋巴细胞的区域设门; C、D: 流式检测 CD4 和 CD8 细胞; E、F: CD3⁺ 细胞在骨髓细胞中的绝对计数及百分比; G: CD4⁺ 细胞在 CD3⁺ 细胞中的绝对计数; * 表示 $P < 0.05$

图 4 Shkbp-1^{-/-} 小鼠骨髓中 CD3⁺、CD4⁺ 升高

Note. A, B: The gated area of CD3⁺ lymphocytes in the bone marrow of C57 mice and shkbp-1^{-/-} mice. C, D: The CD4 and CD8 cells detected by flow cytometry. E, F: Absolute number and percentage of CD3⁺ cells in the bone marrow cells. G: Absolute number of CD4⁺ cells in the CD3⁺ cells, * $P < 0.05$.

Fig. 4 The Count of CD3⁺, CD4⁺ double-positive cells is increased in the bone marrow of Shkbp-1^{-/-} mice

和物质。它有过滤血液的作用,还会对新生的红细胞进行必要的“修整”,并贮有大量的血小板。根据



注:A、B: 流式检测 C57 小鼠和 Shkbp-1^{-/-} 小鼠脾脏中 CD3⁺ 淋巴细胞的区域设门; C、D: 流式检测 CD4 和 CD8 细胞; E: CD3⁺ 细胞在脾脏细胞中的绝对计数; F、G、H: CD4⁺ 细胞、CD8⁺ 细胞、CD4⁺CD8⁺ 双阳性细胞在 CD3⁺ 骨髓细胞中的绝对计数及百分比。* 表示 $P < 0.05$, ** 表示 $P < 0.01$, *** 表示 $P < 0.001$

图 5 Shkbp-1^{-/-} 小鼠脾脏中 CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺、CD4⁺CD8⁺ 双阳性细胞降低

Note. A, B: Flow cytometry detection of spleen CD3⁺ lymphocytes gated area in the C57 mice and Shkbp-1^{-/-} mice. C, D: Detection of CD4 and CD8 cells by flow cytometry; E: Absolute number and percentage of CD3⁺ cells in spleen cells. F, G, H: Absolute count and percentage of CD4⁺ cells, CD8⁺ cells, and CD4⁺CD8⁺ double-positive cells in CD3⁺ cells, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

Fig. 5 The counts of CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺, and CD4⁺CD8⁺ double positive cells are significantly reduced in the spleen of Shkbp-1^{-/-} mice

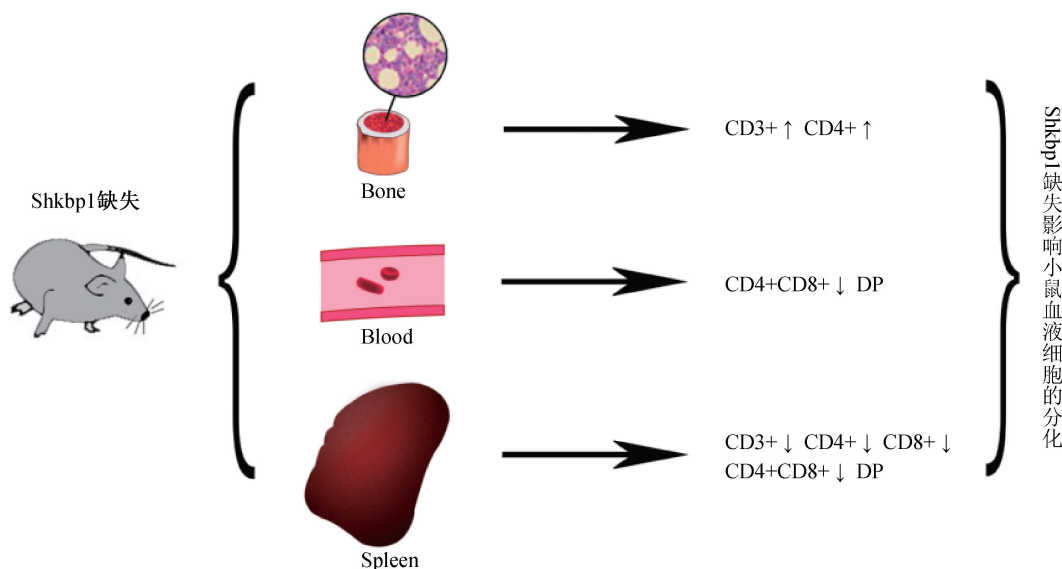


图 6 Shkbp-1^{-/-} 小鼠流式细胞技术检测结果

Fig. 6 Results of flow cytometry detection of Shkbp-1^{-/-} mice

以往的报道, Shkbp1 可以竞争抑制 CIN85 和 c-Cbl 的结合, 从而阻断表皮生长因子受体的内吞和降解, 也能上调表皮生长因子受体相关的报告基因的转录水平, 那么是否 Shkbp1 可能也是通过与 CIN85 竞争引起了 c-Cb-1 变化, 参与了血液的分化, 有待

进一步研究。

总之, 我们研究结果表明 Shkbp1 参与血液的成熟分化, 并影响了免疫细胞数量的改变, 为深入了解血液的分化奠定了基础。

4 致谢

本研究由国家自然科学基金(No. 81472336 和 No. 31471290) 和广东省科技计划(2015A030302086、2014A020212313 和 2015A030302085) 共同资助,感谢广东省实验动物监测所罗挺老师在流式检测方面给予的支持。

参考文献:

- [1] 冯利锋,钱凯先,耿建国. c-Cbl 介导的对 P-选择素诱导 $\beta 2$ 整合素活化的负反馈调控机制的研究和 SHKBP1 抑制表皮生长因子受体(EGFR)信号负调控机理的研究[D]. 浙江大学, 2008. 1-119.
- [2] Lajoie P, Partridge EA, Guay G, et al. Plasma membrane domain organization regulates EGFR signaling in tumor cells [J]. J Cell Biol, 2007, 179: 341-356.
- [3] Kowanetz K, Husnjak K, Ho"ller D, et al. CIN85 associates with multiple effectors controlling intracellular trafficking of epidermal growth factor receptors [J]. Mol Biol Cell, 2004, 15: 3155-3166.
- [4] Ivan Dikie. CIN85/CMS family of adaptor molecules [J]. FEBS Lett, 2002, 529: 110-115.
- [5] Sharma SV, Bel DW, Settleman J, et al. Epidermal growth factor receptor mutations in lung cancer[J]. Nature Rev Cancer, 2007, 7(3): 169-181.
- [6] Mattila E, Pellinen T, Jonna Nevo J, et al. Negative regulation of EGFR signalling through integrin- $\alpha 1 \beta 1$ -mediated activation of protein tyrosine phosphatase TCPTP [J]. Nature Cell Biol, 2004, 7: 78-85.
- [7] Soubeyran P, Kowanetz K, Zymkiewicz I, et al. Cbl-CIN85-endophilin complex mediates ligand-induced downregulation of EGF receptors [J]. Nature, 2002, 416: 183-187.
- [8] Huo HR, Guo XM, Hong SY, et al. Lipid rafts/caveolae are essential for insulin-like growth factor-1 receptor signaling during 3T3-L1 preadipocyte differentiation induction [J]. J Biol Chem, 2003, 278(13): 11561-11569.
- [9] Liu JP, Liu NS, Yuan HY. Human homologue of SETA binding protein 1 interacts with cathepsin B and participates in TNF-Induced apoptosis in ovarian cancer cells [J]. Mol Cell Biochem, 2006, 292(1-2): 89-95.
- [10] Greif PA, Eck SH, Konstandin NP, et al. Identification of recurring tumor-specific somatic mutations in acute myeloid leukemia by transcriptome sequencing [J]. Leukemia, 2011, 25(5): 821-827.
- [11] Feng L, Wang JT, Jin H. SH3KBP1-binding protein 1 prevents epidermal growth factor receptor degradation by the interruption of c-Cbl CIN85 complex[J]. Cell Biochem Funct, 2011, 29(7): 589-596.
- [12] 何晓东,李卫东,王丽京,等. Shkbp1 等几种基因工程小鼠纯合品系的建立 [D]. 广东药学院, 2011: 1-54.
- [13] 周泽启,李江超,张潇涵,等. PSGL-1 缺失导致 MDSCs 上调 [J]. 中国比较医学杂志, 2015, 25(6): 42-45.
- [14] 李江超,张潇涵,刘擎,等. LFA-1 缺失诱导小鼠的 CD3⁺ 细胞上调[J]. 基因组学与应用生物学, 2016, 35(3): 1-6.
- [15] 吴晓娜,蒋红兵. 流式细胞术的工作原理及其临床应用[J]. 中国医疗设备, 2011, 26(3): 91-93.
- [16] 河春姬,杨声,董颖,等. 流式细胞技术检测人异体血液回输方法研究 [J]. 体育科学, 2015, 35(1): 93-96.
- [17] 唐甜,张子宁,傅雅静,等. 2939 例临床患者 CD4⁺ ~ CD8⁺ T 淋巴细胞检测结果的回顾性分析 [D]. 中国医科大学学报, 2013, 42(11): 978-981.
- [18] 贺政新,陈晶,王宪灵,等. RA 患者外周血检出大量 CD4⁺ ~ CD8⁺ 双阳性 T 淋巴细胞 1 例[J]. 国际检验医学杂志, 2014, 35(15): 2119-2119.
- [19] Gupta AK, Keshav K, Kumar P. Decalcified allograft in repair of lytic lesions of bone: A study to evolve bone bank in developing countries [J]. Indian J Orthop, 2016, 50(4): 427-33.
- [20] 唐晓龙,王瑞平. 益气健脾方对环磷酰胺化疗后荷瘤小鼠骨髓和免疫功能影响的实验研究 [D]. 南京中医药大学, 2014.
- [21] 李宗芳,张澍. 脾脏的基础研究进展与展望 [D]. 西安交通大学学报, 2008, 29(1): 1-6.

[修回日期]2016-11-16