

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2014.25.015

## 阻断 p38MAPK 信号通路对大鼠肝星状细胞活性及 c-myc 蛋白表达的影响\*

郑人源<sup>1</sup>, 张琴<sup>1</sup>, 卓强<sup>1</sup>, 蒋明德<sup>2△</sup>, 梅浙川<sup>3</sup>

(1. 成都医学院生物医学系, 成都 610500; 2. 成都军区总医院消化内科, 成都 610083; 3. 重庆医科大学附属第二医院消化内科 400010)

**摘要:**目的 研究 p38MAPK 对乙醛刺激的大鼠肝星状细胞(HSC)活性及 c-myc 蛋白表达的影响,探讨影响酒精性肝纤维化的相关机制。方法 用不同浓度的 p38 特异性阻断剂 SB203580 干预乙醛刺激的大鼠 HSC,显微镜下观察细胞形态变化,MTT 法测定细胞增殖,流式细胞术检测细胞周期分布,SABC 法检测 c-myc 蛋白表达。结果 (1)乙醛刺激后的 HSC 体积增大,增殖迅速,但随着加入 SB203580 的药物浓度增大,细胞增殖变缓,体积变小,变形的细胞增多。(2)p38 阻断剂 SB203580 可抑制乙醛刺激的 HSC 增殖,且高药物浓度组抑制效果更明显。(3)随着阻断剂浓度增高,G<sub>0</sub> 及 G<sub>1</sub> 期细胞增加,S 期细胞逐渐减少,同时 c-myc 蛋白表达阳性率减少。结论 阻断 p38MAPK 通路活性能抑制乙醛刺激的大鼠 HSC 增殖,可能与下调 c-myc 蛋白表达,阻止细胞由 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期进入 S 期的 DNA 合成有关。

**关键词:**肝硬化;肝星状细胞;p38MAPK;c-myc 基因

中图分类号:R575.2

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2014)25-3307-04

### Effect of blocking p38MAPK signal pathway on activity of rat hepatic stellate cells and c-myc protein expression\*

Zheng Renyuan<sup>1</sup>, Zhang Qin<sup>1</sup>, Zhuo Qiang<sup>1</sup>, Jiang Mingde<sup>2△</sup>, Mei Zhechuan<sup>3</sup>

(1. Biomedical School, Chengdu Medical College, Chengdu, Sichuan 610500, China; 2. Department of Gastroenterology, General Hospital of Chengdu Military Region, Chengdu, Sichuan 610083, China; 3. Department of Gastroenterology, Second Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing 400010, China)

**Abstract:** Objective To study the effect of p38MAPK on the activity and c-myc protein expression in rat acetaldehyde-induced hepatic stellate cell(HSC), and to investigate the alcoholic liver fibrosis related mechanism. **Methods** The different concentrations of SB203580 as the p38 specific blocker was adopted to conduct the intervention on rat acetaldehyde-induced HSC. The cellular morphological change was observed by the microscope. The cell proliferation was detected by MTT, the cell cycle was analyzed by flow cytometry(FCM), and the expression of c-myc protein was examined by the SABC method. **Results** (1) after acetaldehyde stimulation, HSC was increased in size and proliferated rapidly, but with the added SB203580 concentration increase, the cellular proliferation was slowed down, the cells size was diminished and the deformed cells were increased. (2) The proliferation of acetaldehyde-induced HSC was inhibited by different doses of SB203580, and the higher concentration has the more significant inhibiting effect. (3) With the SB203580 concentration increase, the cells at the phase G<sub>0</sub> and G<sub>1</sub> were increased, while the cells at the phase S were decreased, at the same time the expression positive rate of c-myc protein was decreased. **Conclusion** Blocking p38MAPK pathway activity could inhibit the proliferation of acetaldehyde-induced HSC, which may be related to the down-regulation of C-myc protein expression and blocking the DNA synthesis in cells entering from G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> phase to S phase.

**Key words:** liver cirrhosis; hepatic stellate cell; p38MAPK; c-myc gene

肝硬化是一种临床常见的消化系统疾病,通常由肝纤维化(hepatic fibrosis, HF)发展而来。肝星状细胞(hepatic stellate cell, HSC)的活化与增殖是 HF 发生的关键环节,其中酒精性肝纤维化发病的关键因素是乙醇在肝内的代谢物乙醛刺激 HSC 活化与增殖<sup>[1]</sup>。促分裂素原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinases, MAPK)信号传导通路是真核细胞内一条重要的信号转导通路, p38MAPK 是其 4 大亚族之一,其在生理功能、病理过程及细胞增殖、分化、炎症及应激反应的调控中起着至关重要的作用。SB203580 是一种吡啶咪唑类抑制剂,其可通过特异性抑制 p38MAPK 的活性而阻断 p38MAPK 信号转导通路<sup>[2]</sup>。C-myc 是一种功能很多的可调节基因,对细胞的增殖、凋亡、分化和周期调控<sup>[3]</sup>有关。本实验用 p38MAPK

阻断剂 SB203580 处理乙醛刺激的大鼠 HSC,观察大鼠肝星状细胞形态、增殖活性、细胞周期及 c-myc 蛋白的表达变化,进一步探讨 p38 信号传导通路影响酒精性肝纤维化发生的相关机制。

### 1 材料与方法

**1.1 主要材料和仪器** 大鼠 HSC 细胞株(四川大学生物治疗国家重点实验室); SABC 免疫组化染色试剂盒(武汉博士德生物工程有限公司), c-myc 单克隆抗体(博士德公司进口分装), 浓缩型 DAB 试剂盒(北京中杉生物技术有限公司), SB203580 (NEB 公司), 碘化丙啶(Sigma 公司), Dulbecco 改良的 Eagle(DMEM)培养基(Thermo Fisher 公司), 胰蛋白酶(Amresco 公司), 苏木素染料, 中性树脂, 乙醛和乙醇均为分析纯。美国 Beckman-Coulter XL4 型流式细胞仪, CO<sub>2</sub> 培养箱

(Thermo 公司), 高速离心机 (Thermo 公司), MK3 型酶标仪 (Thermo 公司), 倒置光学荧光相差显微镜 (Olympus 公司)。

## 1.2 方法

**1.2.1 HSC 的培养** 以  $1 \times 10^5$  /mL 的细胞浓度接种于 125 mL 细胞瓶, 添加适量的 HEPES、抗菌药物 (100 U/mL 青霉素与 100  $\mu$ g/mL 链霉素) 于 10% 小牛血清的 DMEM 高糖型培养基中, 温度 37  $^{\circ}$ C、CO<sub>2</sub> 浓度 5% 的细胞培养箱中培养, 根据细胞贴壁生长情况 2~3 d 换液 1~2 次, 传代时间为 4~5 d, 传代细胞前, 用 0.25% 胰酶加 0.02% 乙二胺四乙酸 (EDTA) 进行消化。

**1.2.2 实验分组** 空白对照组 (A 组): 细胞接种后仅加入含小牛血清 10% 的 DMEM 培养液; 乙醛对照组 (B 组): A 组基础上加乙醛至 200  $\mu$ mol/L (终浓度); 实验组: 在 B 组基础上加入 p38 特异性抑制剂 SB203580, 终浓度分别为 5、10、20、30  $\mu$ mol/L, 分别为 C、D、E、F 组。

**1.2.3 HSC 形态变化的光镜观察** 培养 HSC 至对数生长期, 用 0.25% 胰酶消化, 低速离心, 吹打后加 DMEM 培养基将细胞浓度调整稀释为  $1 \times 10^5$  /mL 接种于 6 孔细胞培养板中, 每个实验组设 3 个平行孔, 每孔中加入 4 mL 培养液, 24 h 换液 1 次, 显微镜下观察细胞长至 70% 左右融合度时, 将 DMEM 培养基换成无血清培养液同步化处理 24 h。按以上实验分组方法对 A~F 组细胞分别进行干预处理并标记分组, 继续放入 CO<sub>2</sub> 培养箱中恒温培养 24 h, 每 12 小时补充乙醛 1 次。时间点到达后取出 6 孔板, 置倒置显微镜下观察。

**1.2.4 噻唑蓝 (MTT) 比色法测定 HSC 活性** 取培养至对数生长期的 HSC 细胞, 用含 10% 小牛血清的 DMEM 培养基将其稀释成  $5 \times 10^7$  /L 的细胞悬液, 接种于 96 孔细胞培养板中, 每孔细胞悬液量为 200  $\mu$ L, 每个实验组设重复实验孔 6 个。置于 CO<sub>2</sub> 培养箱中恒温培养, 根据细胞贴壁生长情况更换培养液, 在光学显微镜下观察到细胞生长至 70% 左右融合度时, 换为无血清培养基同步化处理按上述分组方法对各实验组进行干预处理并标记分组, 放入 37  $^{\circ}$ C 的 CO<sub>2</sub> 培养箱中继续培养, 12 h 补充 1 次乙醛, 培养 24 h 后每孔均加入浓度为 5 g/L 的 MTT 溶液 20  $\mu$ L, 再置于 CO<sub>2</sub> 培养箱中 4 h, 用快速翻板法小心弃去培养液, 轻轻倒扣培养板于滤纸上吸去多余液体。每孔加 DMSO 200  $\mu$ L, 放置在回旋振荡器上轻微振荡 30 min 后用酶标仪双波长测定其吸光度值 (OD 值), 测定波长 570 nm, 参考波长 630 nm, 以消除非特异性光吸收效应, 计算公式:  $OD = OD_{570 \text{ nm}} - OD_{630 \text{ nm}}$ , OD 值大小反映细胞增殖水平高低。细胞增殖抑制率 (IR) 的计算:  $IR = (1 - T/C) \times 100\%$ , 其中 T 为实验处理孔 OD 值, C 为对照处理孔 OD 值。

**1.2.5 流式细胞术 (FCM) 分析 HSC 细胞周期** 稀释 HSC 浓度约为  $1 \times 10^5$  /mL, 接种于 6 孔培养板上, 每组设 4 复孔, 培养细胞长至融合度约 70%, 将培养基换成无血清 DMEM 培养基同步化处理 24 h, 按上述分组方法的浓度比例向实验组 (C~F 组) 加入含 SB203580 的无血清培养液预处理 1 h, 再向 B 组和实验组均加入乙醛 200  $\mu$ mol/L (终浓度), 继续于 CO<sub>2</sub> 培养箱中恒温培养, 12 h 后补充乙醛 1 次, 24 h 后取样 (实验组和 A 组各 4 孔)。取样方法为: 用 0.25% 胰酶加 0.02% EDTA 消化细胞, 收集至 10 mL 玻璃离心管, 轻轻吹打使其分散成单个细胞, 用 PBS 洗涤、离心 2 次, 调节每个样品细胞数为  $1 \times 10^6$  /mL, 用微量移液器通过 350 目尼龙网注入 70% 冷乙醇中, 4  $^{\circ}$ C 过夜固定。测定前倒掉乙醇, 用 PBS 洗 2 次后加入 50 mg/mL RNA 酶, 37  $^{\circ}$ C 水浴 1 h, 冰浴终止消化, 加碘化丙啶 (PI) 至终浓

度 500 mg/mL, 避光染色 1 h 后流式细胞仪分析检测。

**1.2.6 链霉素和素-生物素-过氧化物酶复合物技术 (SABC) 法测定 c-myc 蛋白的表达** 按上述实验分组, 将传 1 代的 HSC 细胞悬液稀释至浓度为  $1 \times 10^6$  /L 左右, 接种于放有盖玻片的 6 孔板中, 制作 HSC 细胞爬片, 每个实验组设 3 个重复孔。24 h 后观察到细胞贴片生长, 加培养基至每孔 3 mL, 根据细胞生产情况 1~2 d 换液 1 次, 当显微镜下观察盖玻片上细胞长至约 70% 融合度时更换无血清 DMEM 培养基同步化处理 24 h, 向实验组 (C~F 组) 分别加入终浓度为 5、10、20、30  $\mu$ mol/L SB203580 的无血清培养液预处理 1 h, B 组和实验组均加入 200  $\mu$ mol/L 的乙醛 (终浓度), 于 CO<sub>2</sub> 培养箱中继续培养, 12 h 后补充乙醛 1 次。24 h 后弃去培养基, 用 PBS 洗 3 遍, 每遍 2 min, 按 SABC 试剂盒说明书进行操作: 固定、PBS 冲洗、孵育 c-myc 抗体、二抗孵育、DAB 显色、苏木素复染色、清洗、脱水、透明。最后用中性树脂封片后置于显微镜下观察, 有棕黄色或棕褐色颗粒于细胞内者为蛋白表达阳性结果, 每组随机选择 5 个高倍视野 (200 $\times$ ) 的细胞 (细胞总数大于 1 000 个) 计算 c-myc 蛋白表达阳性率并取均值。

**1.3 统计学处理** 应用 SPSS16.0 软件采用单因素方差分析进行统计学处理, 计量资料用  $\bar{x} \pm s$  表示, 两组间比较采用独立样本 *t* 检验, 以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 各组 HSC 光镜下形态变化** A 组细胞大小生长较均匀, 胞突伸展, 但细胞增殖较为缓慢、不易生长成团; B 组细胞生长大小较为一致, 细胞饱满, 胞体增大, 胞突较多伸展较长, 生长迅速, 细胞成簇成团; SB203580 实验组细胞随着阻断剂浓度的增大, 细胞生长缓慢、不易成团、胞突伸展较少, 胞体缩小、死细胞增多, 见图 1。

**2.2 MTT 测定 HSC 活性变化情况** MTT 实验检测 SB203580 阻断 P38MAPK 通路影响乙醛刺激的 HSC 增殖结果见表 1。乙醛刺激可刺激 HSC 细胞增殖, 反映 HSC 增殖活性的 OD 值显著增高; 分别用 p38 阻断剂 SB203580 5、10、20  $\mu$ mol/L (终浓度) 后, 能明显抑制 HSC 增殖 ( $P < 0.05$ ), 且随浓度增高抑制作用越明显, 当加大至可几乎完全抑制 p38 活性的 SB203580 浓度 (30  $\mu$ mol/L) 时, 抑制作用最明显, IR 为 40.3%, 差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ )。

表 1 阻断 P38 信号通路对乙醛刺激的 HSC 增殖活性的影响 ( $n=6$ )

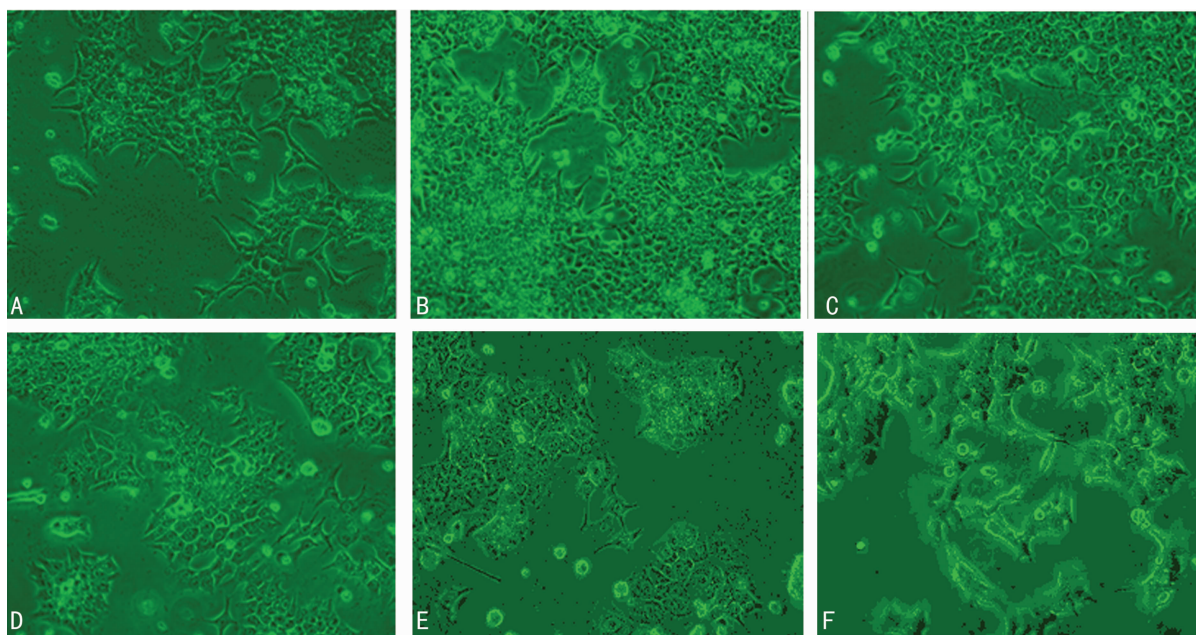
组别	乙醛终浓度 ( $\mu$ mol/L)	SB20358 终浓度 ( $\mu$ mol/L)	OD 值 ( $\bar{x} \pm s$ )	IR (%)
A 组	0	0	0.16 $\pm$ 0.01	—
B 组	200	0	0.57 $\pm$ 0.02	0
C 组	200	5	0.46 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>	19.3
D 组	200	10	0.43 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>	24.6
E 组	200	20	0.39 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>	31.6
F 组	200	30	0.34 $\pm$ 0.01 <sup>b</sup>	40.3

<sup>a</sup>:  $P < 0.05$ , 与 A 组比较; <sup>b</sup>:  $P < 0.01$ , 与 B 组比较, —: 表示无数据。

**2.3 SB203580 对 HSC 周期分布的影响** 如表 2 所示, 乙醛刺激 HSC 后, G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期细胞所占比例减少, S 期、G<sub>2</sub>/M 期细胞比例明显增加 ( $P < 0.05$ ), 细胞活性明显增加, 增殖率提高 (增殖率 57.6%,  $P < 0.05$ ); 采用不同浓度的阻断剂 SB203580 干

预处理后,随着阻断剂浓度的增加,G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期细胞所占比例逐渐上升,S 期细胞所占比例逐渐减少(P<0.05),G<sub>2</sub>/M 期细胞变化不明显,细胞增殖率逐渐降低(P<0.05)。提示 SB203580

可抑制乙醛刺激的 HSC 增殖,阻滞细胞由 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期进入 S 期,而对 G<sub>2</sub>/M 期细胞的影响比较差异无统计学意义(P>0.05)。



A:A 组;B:B 组;C:C 组;D:D 组;E:E 组;F:F 组。

图 1 各组 HSC 细胞光镜下形态(×100)

表 2 SB203580 对乙醛刺激的 HSC 周期的影响(̄x±s,n=4)

组别	SB203580+乙醛 (μmol/L)	细胞周期分布率(%)			增殖率(%)
		G <sub>0</sub> /G <sub>1</sub>	S	G <sub>2</sub> /M	
A 组	0+0	69.8±2.5	21.6±1.5	7.9±1.7	30.1±2.1
B 组	0+200	42.3±1.3 <sup>a</sup>	45.1±2.2 <sup>a</sup>	13.3±1.1 <sup>a</sup>	57.6±1.9 <sup>a</sup>
C 组	5+200	49.8±2.6 <sup>ab</sup>	39.2±1.8 <sup>ab</sup>	11.5±1.5 <sup>a</sup>	50.3±2.5 <sup>ab</sup>
D 组	10+200	58.3±3.4 <sup>ab</sup>	36.1±1.2 <sup>ab</sup>	9.8±0.9	45.8±2.8 <sup>ab</sup>
E 组	20+200	62.2±2.9 <sup>ab</sup>	30.9±2.0 <sup>ab</sup>	6.7±1.1	37.8±3.2 <sup>ab</sup>
F 组	30+200	67.3±2.7 <sup>ab</sup>	27.4±3.1 <sup>ab</sup>	6.2±1.5	33.7±3.9 <sup>b</sup>

<sup>a</sup>:P<0.05,与 A 组比较;<sup>b</sup>:P<0.05,与 B 组比较。

**2.4 HSC 中 c-myc 蛋白阳性表达率** 如表 3 所示,B 组的 HSCs 中 c-myc 蛋白阳性表达率较 A 组显著增加(P<0.05),当分别加入不同浓度 SB203580 后,随着 SB203580 浓度增加,c-myc 阳性表达率逐渐降低,与 B 组比较,差异有统计学意义(P<0.05)。

HSCs 的激活,大量信号通路被激活,这可以维持 HSCs 的活化表型及其细胞的增殖、分泌活性<sup>[5]</sup>。近年来细胞因子及其信号传导通路在 HF 形成中的作用受到关注。MAPK(包括 ERK、JNK、P38)是真核细胞内一条重要的信号转导系统,该转导通路介导了细胞内的多种生物学反应,作为 MAPK 信号通路重要的亚族,p38MAPK 在炎症发生、应激反应、细胞周期和生长、凋亡等多种生理和病理过程中发挥了重要作用<sup>[6-7]</sup>。p38MAPK 广泛分布在细胞胞质中,它的生化结构是具有丝氨酸和酪氨酸双重磷酸化能力的蛋白激酶,由其介导的信号转导途径可以被多种因子和环境应激反应激活,是细胞外生物信号引起细胞内生物化学反应的通道之一<sup>[8]</sup>。激活后的 p38MAPK 可以通过磷酸化来激活下游分子,包括核转录因子和胞浆蛋白,从而调节细胞的基因转录和细胞生长。SB203580 是一种吡啶-异咪唑啉化合物,能够特异性抑制 p38MAPK 通路,其机理为作用于 p38 与 ATP 结合活性位点 Thr106,使两者不能结合,从而失去激酶的活性<sup>[9]</sup>。本实验结果显示,用 SB203580 阻断 p38 通路活性后,HSC 增殖活性被抑制,生长变缓,体积变小,且高浓度 SB203580 组较低浓度组抑制率增加明显。

表 3 阻断 P38 信号通路影响乙醛刺激的 HSC 中 c-myc 表达(n=3)

组别	乙醛终浓度 (μmol/L)	SB20358 终浓度 (μmol/L)	c-myc 阳性表达率 (̄x±s,%)
A 组	0	0	7.4±0.5
B 组	200	0	19.6±1.2 <sup>a</sup>
C 组	200	5	14.3±1.2 <sup>ab</sup>
D 组	200	10	9.7±1.1 <sup>b</sup>
E 组	200	20	6.1±0.6 <sup>ab</sup>
F 组	200	30	4.3±0.5 <sup>ab</sup>

<sup>a</sup>:P<0.05,与 A 组比较;<sup>b</sup>:P<0.05,与 B 组比较。

**3 讨 论**

在各种致纤维化的损伤下,HSCs 从富含维生素 A 的静息细胞表型转变为具有增殖、分化性的肌成纤维表型<sup>[4]</sup>。伴随着

C-myc 作为重要的转录调节因子,其表达产物是调控细胞增殖过程中基因转录的反式作用因子,参与细胞内多种信号传递和基因表达的启动,是细胞增殖中信号传导的必须调节因子,其基因内含多个转录因子的结合位点,同时细胞内多种信号通路也对其进行调控<sup>[10-11]</sup>。影响细胞增殖是 c-myc 的主要生物学功能,同时它也与细胞生长、分化、增殖、凋亡、周期调控密切相关,其调节方向取决于外界信号对细胞的刺激以及细胞所处的周围生理环境<sup>[12-13]</sup>。c-myc 可影响细胞周期,减少 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期细胞数量,促进更多细胞进入 S 期,使静息细胞进入分裂周期,因此,降低 c-myc 基因的表达可引起细胞周期阻滞<sup>[3]</sup>。猜测阻断 p38MAPK 信号通路引起的 HSCs 增殖受抑制与 c-myc 因子作用于 HSC 周期调控有关。为证实以上猜测,我们进一步检测了 HSCs 周期分布以及 c-myc 基因的表达阳性率。结果表明,SB203580 阻断 p38 信号通路能使 HSC 细胞的增殖活性受到抑制,同时处于周期 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期的细胞所占比例上升,S 期的细胞所占比例下降,而且 c-myc 基因表达阳性的细胞减少。提示阻断 p38MAPK 信号通路能使大鼠 HSC 的增殖活性降低,其作用机制可能与引起 HSC 中 c-myc 基因表达的下调以及减少细胞由 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期进入 S 期的 DNA 合成有关。

通过抑制 HSC 的活性,能减少其细胞外基质分泌,阻止以及逆转肝纤维化的发生。本实验初步研究了 p38MAPK 信号通路影响 HSC 活性的相关机制,证实了 c-myc 因子在其中发挥的调控作用。结果对进一步阐明肝纤维化发生的信号机制,寻找防治肝纤维化的可能途径以及抗肝纤维化新药的开发均有重要意义。

#### 参考文献:

- [1] Mormone E, George J, Nieto N. Molecular pathogenesis of hepatic fibrosis and current therapeutic approaches[J]. *Chem Biol Interact*, 2011, 193(3): 225-231.
- [2] Samuel I, Zaheer A, Fisher RA. In vitro evidence for role of ERK, p38, and JNK in exocrine pancreatic cytokine production[J]. *J Gastrointest Surg*, 2006, 10(10): 1376-1383.
- [3] Pez F, Dayan F, Durivault J, et al. The HIF-1-inducible lysyl oxidase activates HIF-1 via the Akt pathway in a positive regulation loop and synergizes with HIF-1 in promoting tumor cell growth[J]. *Cancer Res*, 2011, 71(5): 1647-1657.
- [4] Eng FJ, Friedman SL, Fibrogenesis I. new insights into hepatic stellate cell activation; the simple becomes complex[J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2000, 279(1): 7-11.
- [5] D'ambrosio DN, Walewski JL, Clugston RD, et al. Distinct populations of hepatic stellate cells in the mouse liver have different capacities for retinoid and lipid storage[J]. *PLoS One*, 2011, 6(9): e24993.
- [6] Brown MD, Sacks DB. Compartmentalised MAPK pathways[J]. *Handb Exp Pharmacol*, 2008(186): 205-235.
- [7] Aouadi M, Binetruy B, Caron L, et al. Role of MAPKs in development and differentiation; lessons from knockout mice[J]. *Biochimie*, 2006, 88(9): 1091-1098.
- [8] Zarubin T, Han J. Activation and signaling of the p38 MAP kinase pathway[J]. *Cell Res*, 2005, 15(1): 11-18.
- [9] Gum RJ, McLaughlin MM, Kumar S, et al. Acquisition of sensitivity of stress-activated protein kinases to the p38 inhibitor, SB 203580, by alteration of one or more amino acids within the ATP binding pocket[J]. *J Biol Chem*, 1998, 273(25): 15605-15610.
- [10] Marinkovic D, Marinkovic T, Kokai E, et al. Identification of novel Myc target genes with a potential role in lymphomagenesis[J]. *Nucleic Acids Res*, 2004, 32(18): 5368-5378.
- [11] He C, Hu H, Braren R, et al. C-myc in the hematopoietic lineage is crucial for its angiogenic function in the mouse embryo[J]. *Development*, 2008, 135(14): 2467-2477.
- [12] Sanders JA, Gruppuso PA. Coordinated regulation of c-Myc and Max in rat liver development[J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2006, 290(1): G145-G155.
- [13] Patel JH, McMahon SB. Targeting of Miz-1 is essential for Myc-mediated apoptosis[J]. *Biol Chem*, 2006, 281(6): 3283-3289.

(收稿日期:2014-03-14 修回日期:2014-06-20)

(上接第 3306 页)

- vulgaris[J]. *Iran J Allergy Asthma Immunol*, 2009, 8(1): 53-56.
- [10] Bracke S, Speeckaert R, Van Geel N, et al. Evaluation of commercially available ELISA assays as a tool for monitoring and managing pemphigus patients: a prospective study[J]. *Eur J Dermatol*, 2013, 23(1): 33-39.
- [11] Sardana K, Garg VK, Agarwal P. Is there an emergent need to modify the desmoglein compensation theory in pemphigus on the basis of Dsg ELISA data and alternative pathogenic mechanisms[J]. *Br J Dermatol*, 2013, 168(3): 669-674.
- [12] Wong MM, Giudice GJ, Fairley JA. Autoimmunity in bullous pemphigoid[J]. *G Ital Dermatol Venereol*, 2009, 144(4): 411-421.
- [13] Mutasim DF. Levels of antibodies to BP180 correlate with disease activity in bullous pemphigoid[J]. *Arch Dermatol*, 2000, 136(2): 253-254.
- [14] Yang B, Wang C, Chen S, et al. Evaluation of the combination of BP180-NC16a enzyme-linked immunosorbent assay and BP230 enzyme-linked immunosorbent assay in the diagnosis of bullous pemphigoid[J]. *Indian J Dermatol Venereol Leprol*, 2012, 78(6): 722-727.
- [15] Fairley JA, Bream M, Fullenkamp C, et al. Missing the target: characterization of bullous pemphigoid patients who are negative using the BP180 enzyme-linked immunosorbent assay[J]. *J Am Acad Dermatol*, 2013, 68(3): 395-403.

(收稿日期:2014-04-17 修回日期:2014-06-20)