

金匱腎氣丸對小鼠生精恢復的基因表達譜研究

王寧, 陳西華, 張樹成*, 賀斌, 王尚明, 魏剛, 張斌, 王介東
(國家人口計生委科學技術研究所, 北京 100081)

〔摘要〕 目的:研究金匱腎氣丸對無精子症模型小鼠生精能力恢復作用的睪丸全基因表達譜。方法:12 周齡 NIH 雄性小鼠按照 40 mg·kg⁻¹ 單次 ip 2% 白消安藥液製備無精子症小鼠動物模型,觀察 42 d 後,給予金匱腎氣丸中藥 1 g·kg⁻¹,ig 給藥 78 d (2 個生精週期),以造模後模型組(自然恢復)、溶媒和正常動物為 3 種對照,通過基因芯片技術檢測服用金匱腎氣丸的無精子小鼠與正常對照小鼠之間睪丸中差異表達的基因,對這些基因按照表達差異程度、功能註釋和 Pathway 進行分析。結果:動物實驗結果顯示:無精子症模型小鼠經過 78 d 的金匱腎氣丸 ig 給藥後,在動物體質量、生殖器官組織質量和指數、附睪精子質量(活動率、活動力、濃度)等與生殖能力相關的指標上與模型組比較有明显的改善。基因表達譜芯片結果顯示:服用金匱腎氣丸的無精子小鼠與正常組相比,睪丸中差異表達 2 倍以上的基因 804 個(占 2.53%),其中上调 517 個,低於正常表達 1/2 的 287 個,差異表達 4 倍以上的基因 134 個(占 0.42%)其中上调 127 個,低於正常表達 1/4 的 7 個,提示以正向促進/上调作用為主,以負向抑制/下调作用為輔;主要通過對細胞週期、細胞因子-細胞因子受體作用、Ecm 受體作用、Jak-Stat 信號通路、Mapk 信號通路、Notch 信號通路、Toll 樣受體信號通路和 Wnt 信號通路等 8 個信號通路系統的調節實現生精能力的提高。結論:金匱腎氣丸有助於促進無精子小鼠生精能力的恢復。通過基因芯片檢測後與正常小鼠相比,這種促進作用可能是通過多途徑對生精幹細胞中與細胞增殖分裂相關基因的正向調節實現的。

〔关键词〕 金匱腎氣丸; 基因表達譜; 生精幹細胞; 基因調控; 精子質量
〔中圖分類號〕 R285.5 〔文獻標識碼〕 A 〔文章編號〕 1005-9903(2012)10-0215-06

Gene Expression Profile of Jinkui Shenqi Wan on
the Spermatogenesis Recovery in Azoospermia Mice

WANG Ning, CHEN Xi-hua, ZHANG Shu-cheng*, HE Bin, WANG Shang-ming,
WEI Gang, ZHANG Bin, WANG Jie-dong
(National Research Institute for Family Planning, Beijing 100081, China)

〔Abstract〕 **Objective:** To study the gene expression profile of Jinkui Shenqi Wan on the recovery of spermatogenesis in azoospermia mice. **Method:** Liquid busulfan 2% was injected (ip 40 mg·kg⁻¹) in 12-week-old NIH male mice to prepare azoospermic model. Jinkui Shenqi Wan were administrated to azoospermia mice by gastric irrigation for 78 days (two spermatogenesis cycles) after 42 days of modeling. The testis total mRNAs of Jinkui Shenqi group and normal group were used to study gene expression profile by microarray. **Result:** The important fertility-related indicators such as body weight, reproductive organs and tissue mass index, sperm quality (motility, activity, concentration) and so on were improved significantly in azoospermia mice treated with Jinkui Shenqi Wan for 78 days. Jinkui Shenqi Wan played significant roles in recovering the spermatogenesis of testis in azoospermia mice. Compared with the normal group, microarray results showed that there were 804 genes (2.53%, 517 upregulation, 287 downregulation) with more than two times differential expression and 134 genes (0.42%, 127 upregulation, 7 downregulation) with four times differential expression, respectively. This suggested

〔收稿日期〕 20110919(009)
〔基金項目〕 國家自然科學基金項目(90409016);國家重點基礎研究發展計劃(973 計劃,2010CB530403)
〔第一作者〕 王寧,博士,從事生殖生物學研究,E-mail:wangn333@yahoo.com.cn
〔通訊作者〕 * 張樹成,副研究員,Tel:010-62197760, E-mail:nrifp@263.net

that the main role of Jinkui Shenqi Wan on recovery of spermatogenesis was positive and upregulation, negative and downregulation played secondary roles. Pathway analysis showed these genes expressed in: cell cycle, cytokine-cytokine receptor, Ecm receptors, Jak-Stat signaling pathway, Mapk signaling pathway, Notch signaling pathway, Toll-like receptor signaling pathway and Wnt signaling pathway. **Conclusion:** Testis spermatogenesis of azoospermia mice can be recovered after administration of Jinkui Shenqi Wan by positive controlling genes related to cell proliferation through different pathways.

[**Key words**] Jinkui Shenqi Wan; gene expression profile; germ cells; gene regulation; sperm quality

男性精液质量呈普遍降低趋势已引起广泛关注^[1-2],精液质量的降低导致男性生育力下降,发挥中医药的特殊优势对男性生育能力进行正向干预已经成为目前临床治疗男性不育和提高精液质量的主要手段之一。出自《金匱要略》的金匱肾气丸是中医药精华中的经典名方,主要用于治疗肾虚型疾病,并被历代医家所推崇成为化裁温阳药的基本方,是临床调节男性生殖功能与提高男性生育能力方面的常用方药^[3-5]。作者在前期实验中发现,金匱肾气丸具有明显的对睾丸生精干细胞的保护和促进诱导分化的作用,并同时对主要功能为分泌雄性激素的睾丸间质细胞也具有明显的促进和保护作用^[6-7]。利用基因芯片技术通过细胞基因表达谱分析研究中药的作用机制是近年受到重视的研究手段^[8-10],作者利用该技术对金匱肾气丸在基因水平的作用机制进行了分析。

- 1 材料
- 1.1 药物与试剂 金匱肾气丸(北京同仁堂,批号 5033595),白消安(Sigma),二甲基亚砷(DMSO, Axygen),TRIZOL 试剂(Invitrogen life technologies), Ambion MessageAMP aRNA 试剂盒(Ambion), NucAway 柱(Ambion),无 RNA 酶的糖原(Invitrogen life technologies),均为美国产。
- 1.2 动物 无特定病原菌(SPF 级,三级动物)成年 12 周龄 NIH 雄性小鼠,购自北京市维通利华实验动物技术有限公司,许可证号 SCXK(京)2006-009。
- 1.3 基因芯片 OneArray® Mouse Microarrays (Phalanx, USA)。
- 1.4 仪器 Gene Pix4100 (Molecular Devices, USA)。
- 2 方法
- 2.1 造模方法 动物自由进食常规饲养。无精子症动物模型按照白消安诱导常规方法造模^[11-12],白消安溶解于 DMSO 中配制成 2% 药液,40 mg·kg⁻¹ 单次 ip 给药 40 只动物,第 3 天开始出现死亡,观察 42 d(6 周),陆续死亡 13 只,死亡率 32.5%。溶媒
- 对照组单次 ip DMSO,观察中未见死亡。
- 2.2 分组和处理方法 18 周龄存活小鼠分为 4 组进行实验,白消安造模动物 27 只分为中药组 17 只和模型组 10 只,正常动物分为溶媒对照组 10 只,正常对照组 14 只。4 组同步 ig 处理,中药组给予金匱肾气丸纯净水悬液(根据预实验和 2 批实验结果,确定中药剂量^[6];选用成人临床 5 倍剂量换算给药,含生药 1 g·kg⁻¹,其他 3 组给予纯净水,ig 0.2 mL/日/只,连续给药 78 d(2 个小鼠生精周期)。
- 2.3 观察指标和方法 所有动物最后 1 次给药 24 h 后,称体重,断脊处理,取出双侧睾丸和附睾、前列腺、储精囊、会阴复合体,称质量根据动物体质量、生殖器官组织质量计算组织质量指数。
- 组织质量指数 = 组织质量(mg)/体重(g)
- 一侧的睾丸和附睾固定于 Bouin 液中,常规石蜡包埋,5 μm 切片,HE 染色,镜检。另一侧附睾组织,采用附睾头-培养基泳动法^[6]进行精子质量观察,精子活力分级为快速前向运动(a 级)、慢速前向运动(b 级)、非前向运动(c 级),活动率为 a + b + c。另一侧睾丸,迅速液氮冷冻后,于 -70 ℃ 冰箱中保存,用于睾丸全基因表达谱研究。
- 2.4 基因芯片检测 采用 Phalanx 公司的 Mouse OneArray™ 芯片,该芯片以 Mouse Exonic Evidence Based Oligonucleotide(MEEBO)设计为基础,每芯片上有 29 922 小鼠基因探针,以及 1 800 个实验探针。
- 2.5 睾丸全基因组表达谱分析 RNA 样品制备 按照 TRIZOL 试剂使用说明书提取睾丸组织总 RNA,变性琼脂糖凝胶电泳鉴定 RNA 的完整性,合成 cDNA 第 1 链、第 2 链。双链 cRNA 产物纯化后,用 aa-UTP aRNA 对双链 cRNA 进行间接标记,经过预杂交、杂交和洗片后对结果扫描,数据读取。
- 2.6 数据处理及统计学分析 基因筛选的数据分析以 2 组间上调或下调 2 倍以上为有意义的差异基因。差异表达基因分析、芯片数据的统计学分析、聚类分析采用 Mouse OneArray(®) Annotation MOA2

release 2.0 软件。其他数据分析通过建立 Excel 数据库进行统计学处理,进行双样本 *t* 检验。

3 结果

3.1 金匱肾气丸对无精子症模型小鼠生殖能力作用

的评价 根据动物体质量、生殖器官组织质量和指数、附睾精子质量(活动率、活动力、浓度)的分析,显示金匱肾气比模型组具有明显促进生精能力恢复的作用($P<0.05$, $P<0.000\ 1$)。见表 1~2。

表 1 金匱肾气丸连续给药 78 d 对无精子症模型小鼠体质量和生殖器官质量的影响

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	<i>n</i>	体质量/g	组织质量/mg					组织质量指数	
				睾丸	附睾	前列腺	储精囊	会阴复合体	睾丸	附睾
金匱肾气	1	17	34.25±4.05	191.5±26.2	88.1±10.6	1 080.7±231.5	2 546.3±282.6	51.7±5.3	57.0±12.7	26.3±2.7
模型	-	10	29.01±3.41	140.5±37.3	67.3±13.1	1 047.2±249.6	2 453.8±669.4	57.1±9.5	48.6±13.0	23.7±6.7
溶媒对照	-	10	42.32±2.33 ³⁾	258.1±33.1 ³⁾	112.9±16.7 ³⁾	1 055.9±211.9	2 430.1±417.9	53.6±10.1	60.7±8.9 ²⁾	26.7±4.0
正常对照	-	14	42.16±2.83 ³⁾	254.6±32.4 ³⁾	113.1±16.4 ³⁾	1 075.2±222.5	2 336.8±463.8	57.5±9.0	61.2±8.7 ²⁾	26.9±.3.8

注:与模型组比较¹⁾ $P<0.05$,²⁾ $P<0.01$,³⁾ $P<0.001$ (睾丸、附睾为左右组织质量之和)。

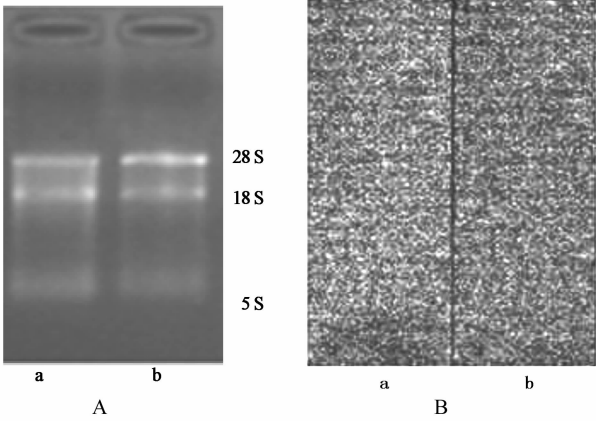
表 2 金匱肾气丸连续给药 78 d 对无精子症模型小鼠附睾精子活动力和密度的影响

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	<i>n</i>	活动率 /%	活动力/%			密度 /×10 ⁶ /mL
				优秀活动力 (a 级)	良好活动力 (b 级)	优良 (a+b 级)	
金匱肾气	1	17	41.59±14.95	11.18±5.80	13.18±6.40	24.35±11.62	21.12±8.79
模型	-	10	13.05±9.66 ²⁾	1.20±1.67 ²⁾	3.40±2.86 ²⁾	4.60±4.29 ²⁾	7.85±4.42 ²⁾
溶媒对照	-	10	59.93±8.69 ¹⁾	20.36±6.34 ¹⁾	21.43±4.13 ¹⁾	41.79±9.12 ²⁾	44.21±11.94 ²⁾
正常对照	-	14	59.45±9.40 ¹⁾	19.60±6.36 ¹⁾	21.45±4.83 ¹⁾	41.05±9.88 ²⁾	44.20±12.55 ²⁾

注:与金匱肾气组相比¹⁾ $P<0.01$,²⁾ $P<0.001$ (模型组与其他 3 组比较:各项指标均 $P<0.001$)。

3.2 睾丸全基因芯片分析 根据以上生殖能力分析结果,选择正常对照组和金匱肾气实验组各 5 只动物单侧睾丸组织,进行睾丸全基因表达谱的测试分析。睾丸组织总 RNA 抽提电泳结果显示其 18S

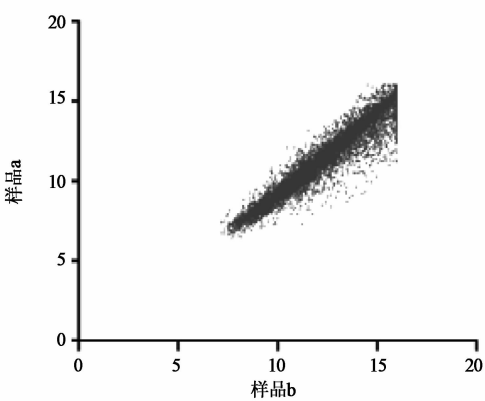
和 28S 条带均清晰,说明 RNA 的纯度达到实验设计要求,见图 1A。小鼠睾丸 cDNA 探针标记 Cy3 荧光素杂交的结果,见图 1B。实验组和对照组 2 样品重复实验的基因表达谱散点图,见图 2。



a. 正常对照组;b. 金匱肾气丸 1 g·kg⁻¹ 组

图 1 睾丸总 RNA 提取(A)及睾丸组织 cDNA 杂交

3.2.1 小鼠睾丸全基因表达谱芯片检测 通过计算机扫描和定量分析,金匱肾气与正常组比较在检测的 31 722 个基因和探针中,共有 804 个基因表达具有 2 倍以上明显差异(占 2.53%),其中上调基因 517 个(占 1.63%),低于正常表达 1/2 的基因 287



样品 a. 正常对照组;样品 b. 金匱肾气丸 1 g·kg⁻¹ 组

图 2 睾丸组织基因表达谱散点图

个(占 0.90%)。差异 4 倍以上的上调基因 127 个,低于正常表达 1/4 的基因 7 个,见表 3~5。
3.2.2 基因功能注释 对差异表达 4 倍以上的基因经过功能注释分析后发现,上调基因与细胞间通讯、信号转导相关的基因所占比例较高;下调基因以

表 3 小鼠睾丸全基因表达谱芯片的基因表达差异数目			
基因变化	基因表达差异 /倍	基因数 /个	占测试基因 /%
上调	> 10	14	0. 04
	8 ~ 10	15	0. 05
	6 ~ 8	24	0. 08
	4 ~ 6	74	0. 23
	2 ~ 4	390	1. 23
下调	低于正常表达 1/4	7	0. 02
	1/2	280	0. 88
合计		804	2. 53

表 4 小鼠睾丸全基因表达谱差异表达上调 10 倍以上的基因

Genebank 编号	基因	名称	上调/倍
NM_025962	1810037K07Rik	甲基丙二酸尿症 cblC 型	17. 33
NM_172512	Gabpb2	GA 重复序列结合蛋白	17. 20
XM_131279	4933402J24Rik	视黄醛结合蛋白 1 样 1	15. 43
NM_053073	Lrp8	低密度脂蛋白受体相关蛋白 1	14. 27
NM_146369	Olfir434	嗅觉受体 434	14. 14
NM_009170	Shh	sonic hedgehog	13. 50
NM_177413	B230343H07Rik	NEL 样蛋白 1	13. 46
NM_028622	1110014K05Rik	后期角化信封蛋白 1C	13. 04
NM_010875	Ncam1	神经细胞粘附因子 1	13. 01
NM_010908	Nfkbib	核因子 κ 轻多肽基因增强 B 细胞抑制剂	11. 96
NM_175682	9930021D14Rik	RIKEN cDNA 9930021D14 gene	10. 75
NM_026346	Fbxo32	F-盒蛋白 32	10. 63
NM_146353	Olfir706	嗅觉受体 706	10. 25
XM_489132	9330158H04Rik	RIKEN cDNA 9330158H04 gene	10. 16

表 5 小鼠睾丸全基因表达谱差异表达低于正常表达 1/4 的基因

Genebank 编号	基因	名称	差异倍数/倍
NM_008581	Mela	黑色素瘤抗原	5. 72
NM_016762	Matn2	非胶原性细胞外基质蛋白家族	5. 66
XM_144080	9530096D07Rik	RIKEN cDNA 9530096D07 gene	4. 57
NM_010685	Lamp2	溶酶体膜糖蛋白 2	4. 19
NM_011610	Tnfrsf1b	肿瘤坏死因子受体超家族成员 1B	4. 10
XM_355379	2610311B01Rik	磷脂酶 A2	4. 05
NM_130872	Krtap16-3	角蛋白关联蛋白 16-3	4. 01

识,传统的方法周期长、耗时多且关键作用点不易把握^[15],基因芯片技术的应用为探求中药作用的靶点、认识其功效中的主要事件和阐明其作用机制提供了较好的手段。

蛋白质和糖类的代谢等种类为主,但所占比例都很小。见表 6 ~ 7。

3.2.3 信号通路分析 (Pathway 分析) 金匱肾气与对照组相比,差异基因主要表现在 8 个信号通路系统方面,包括细胞周期、细胞因子-细胞因子受体作用、Ecm 受体作用、Jak-Stat 信号通路、Mapk 信号通路、Notch 信号通路、Toll 样受体信号通路和 Wnt 信号通路等。

4 讨论

男性精液质量下降和男性生育能力降低导致男性不育成为一种新的常见病^[13-14],在干预和治疗上中医中药具有天然特殊的优势。对中药药理学的认

表 6 上调基因功能注释(主要部分)

Functional Annotation	功能注释	基因数	功能基因/ 检测基因 /%	与功能相关 /P
receptor	受体	36	28.3	5.9E-9
cell communication	细胞通讯	46	36.2	7.5E-7
signal transduction	信号转导	44	34.6	1.5E-6
signal transducer activity	信号转导活性	44	34.6	3.2E-6
receptor activity	受体活性	38	29.9	5.8E-6
G-protein coupled receptor protein signaling pathway	G 蛋白偶联受体蛋白信号通路	30	23.6	6.1E-6
cell surface receptor linked signal transduction	细胞表面受体连接信号转导	32	25.2	8.7E-6
organismal physiological process	有机体生理过程	31	24.4	0.001
response to stimulus	应激反应	34	26.8	0.0015

表 7 下调基因功能注释(主要部分)

Functional Annotation	功能注释	基因数	功能基因/ 检测基因 /%	与功能相关 /P
biopolymer metabolism	生物大分子代谢	3	42.9	0.027
signal	信号	3	42.9	0.028
glycoprotein	糖蛋白	3	42.9	0.037
disulfide bond	二硫键	3	42.9	0.039
nucleobase, nucleoside, nucleotide and nucleic acid metabolism	碱基、核苷、核苷酸和核酸代谢	3	42.9	0.042

明确的促进无精子模型小鼠生殖能力恢复的作用。睾丸全基因表达谱分析发现金匱肾气丸对 804 个基因具有明显调节作用,其中上调基因 517 个(占 1.63%),低于正常表达 1/2 的基因 287 个(占 0.90%);具有较强烈作用(差异表达 4 倍以上)的上调基因 127 个,低于正常表达 1/4 的基因 7 个。提示提示金匱肾气丸在促进生精过程中的基因表达,以正向促进/上调作用为主,以负向抑制/下调作用为辅。

在表达为正向促进/上调作用的基因中,高度差异表达 10 倍以上的 14 个基因中,Gabpb2(GA 重复序列结合蛋白)基因和 Lrp8(低密度脂蛋白受体相关蛋白 8)基因的表达分别上调 17.20 倍和 14.27 倍。由 Gabpb2 基因编码的是 GA 重复序列结合蛋白(GABP) β 2 亚基。GABP 是一个异二聚体转录因子,许多基因的启动子区域均有 GABP 的多个结合位点,在小鼠早期胚胎发育和整个细胞周期的进程中 GABP 是必需的^[16]。低密度脂蛋白受体相关蛋白(LRP)是广泛表达于多种组织的大分子,可以介导细胞的内吞作用^[17],可以参与脂蛋白代谢、蛋白酶降解的生理生化过程、脉管系统保护^[18],细胞迁

移调控等重要生理过程^[19]。提示金匱肾气丸通过激活细胞增殖、调整精子发生障碍、诱导和促进睾丸中生精干细胞的增殖能力实现促进生精能力的恢复和提高。

本实验中发现,除了一些基因的表达差异显著外,金匱肾气丸主要通过 8 个信号通路系统的调节实现生精能力的提高。其中,Jak-Stat 信号通路、Mapk 信号通路以刺激细胞的有丝分裂为主^[20-21],Notch 信号通路的主要作用是其调控细胞增殖、分化和凋亡^[22]。细胞周期、细胞因子-细胞因子受体作用、Ecm 受体作用这些通路则涉及到细胞间的信号转导。

在本实验的动物实验部分我们设立了 3 种对照,通过对小鼠体质量、生殖器官组织质量和指数、附睾精子质量(活动率、活动力、浓度)等与生殖作用相关指标的分析,均表现出金匱肾气对生精能力的促进作用,与造模自然恢复组比较具有明显的改善,接近无损伤的正常组。因此,本实验在进行芯片分析中,未采用造模后自然恢复组做为对照,仅完成正常对照的比较分析,反应出金匱肾气对无精子小

鼠生精能力恢复的促进作用。

综上所述,金匱肾气对生精干细胞的促进作用是多基因多信号通路共同参与的结果,尤其是以众多基因的上调刺激生精干细胞的增殖能力恢复,对睾丸中生精干细胞的促进保护作用为主。本实验结果可为临床治疗提供一些理论依据。

[参考文献]

[1] 任彤彤,张树成,王介东. 人类精液质量变化的趋势[J]. 国外医学:计划生育/生殖健康分册,2006,25(1):3.

[2] 张树成,王弘毅,王介东. 1981 ~ 1996 年我国有生育力男性精液质量的变化分析[J]. 生殖与避孕,1999,19(1):27.

[3] 黎巍威,王学美. 中医从“肾”防治阿尔茨海默病的现代研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2010(13):227.

[4] 马亮,刘华剑,南亚昀,等. 金匱肾气丸对腺嘌呤致不育大鼠精子质量与肾脏功能的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(8):184.

[5] 赵宇昊,高忠英,史成和,等. 金匱肾气丸主治证候与君药辨析[J]. 中国实验方剂学杂志,2009(12):112.

[6] 张树成,贺斌,王尚明,等. 五子衍宗丸和金匱肾气丸对动物生精功能影响的比较研究[J]. 中国计划生育学杂志,2009,17(7):401.

[7] Zhang Shu-Cheng, He Bin, Wang Jie-dong et al. The comparative mechanisms study of Wuziyanzong Pills and Jinkuishenqi Pills on the function of Shenjing and Shenqi. [C]. Asian J Andrology, 2009, 11 (Suppl1):152.

[8] 刘文泰,李丽华,戴军. 生物芯片技术与中药作用机制研究的思路与方法[J]. 中国中医基础医学杂志,2008,14 (11):845.

[9] 杨裕华,李震. 金匱肾气丸对劳倦过度房室不节肾阳虚小鼠模型影响的脑基因芯片研究[J]. 辽宁中医杂志,2008,35(5):773.

[10] 毛秉豫,谢东霞. 加味四物汤对自发性高血压大鼠心肌基因表达谱的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2010(4):142.

[11] Bucci L R, Meistrich M L. Effects of busulfan on murine spermatogenesis: cytotoxicity, sterility, sperm

abnormalities, and dominant lethal mutations[J]. Mutat Res,1987,176(2):259.

[12] 张树成,贺斌,王尚明,等. 少精子症和无精子症动物模型及其在中药研究中的应用[J]. 四川中医,2009,27(8):40.

[13] 张树成,贺斌,任彤彤,等. 我国男性精液质量的评价与建立生殖资源数据库的意义[J]. 中国计划生育学杂志,2005,13(8):468.

[14] 张树成,贺斌,王弘毅,等. 有关环境与男性精液质量变化的几个问题-我国男性精液质量下降的最新数据[J]. 中国计划生育学杂志,2003,11(3):189.

[15] 黄臣虎,陆茵,高晓君,等. 中药血清药理学研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(10):266.

[16] Yu S, Cui K, Jothi R, et al. GABP controls a critical transcription regulatory module that is essential for maintenance and differentiation of hematopoietic stem/progenitor cells[J]. Blood,2011,117(7):2166.

[17] Shen G Q, Li L, Girelli D, et al. An LRP8 variant is associated with familial and premature coronary artery disease and myocardial infarction [J]. Am J Hum Genet,2007,81(4):780.

[18] Robertson J O, Li W, Silverstein R L, et al. Deficiency of LRP8 in mice is associated with altered platelet function and prolonged time for *in vivo* thrombosis[J]. Thromb Res,2009,123(4):644.

[19] Wang L, Wang X, Laird N, et al. Polymorphism in maternal LRP8 gene is associated with fetal growth[J]. Am J Hum Genet,2006,78(5):770.

[20] Zhou L, Luan H, Dong X, et al. Activation of the PI3K/Akt and MAPK signaling pathways antagonizes adriamycin-induced HL-60 leukemia cell apoptosis[J]. Mol Med Report,2010,3(4):641.

[21] Sheng X R, Posenau T, Gumulak-Smith J J, et al. Jak-STAT regulation of male germline stem cell establishment during Drosophila embryogenesis[J]. Dev Biol,2009,334(2):335.

[22] Wang M M. Notch signaling and Notch signaling modifiers [J]. Int J Biochem Cell Biol, 2011. 43 (11):1550.

[责任编辑 聂淑琴]