

文章编号:1000-5404(2012)07-0593-04

论著

G 蛋白偶联受体激酶 4 对大鼠血管平滑肌细胞 AT₁ 受体的调节作用

刘莉^{1,2}, 杨剑^{2,3}, 陈彩宇², 王微², 周永巧^{1,2}, 韩愈², 何多芬², 周林², 曾春雨² (515041 广东汕头, 汕头大学医学院第一附属医院心内科¹; 400042 重庆, 第三军医大学大坪医院野战外科研究所: 心血管内科, 重庆市心血管病研究所², 营养科³)

[摘要] 目的 应用 siRNA 干扰抑制大鼠胸主动脉血管平滑肌细胞 G 蛋白偶联受体激酶 4(G protein-coupled receptor kinase 4, GRK4) 的表达, 探讨 GRK4 对血管紧张素 II 1 型(angiotensin II type 1, AT₁) 受体的调节作用。方法 免疫组化检测大鼠回结肠动脉血管平滑肌组织 GRK4 蛋白表达; 以大鼠胸主动脉平滑肌细胞株(A10 细胞株) 为研究对象, 免疫印迹检测 GRK4、AT₁ 受体蛋白表达变化, 免疫共沉淀检测 GRK4 和 AT₁ 受体的相互作用和 AT₁ 受体磷酸化改变。结果 大鼠动脉平滑肌组织 GRK4 表达良好; siRNA 干扰后, GRK4 蛋白表达明显下降 ($P < 0.05$); AT₁ 蛋白表达降低 ($P < 0.05$), AT₁ 受体磷酸化明显增强 ($P < 0.05$); GRK4 和 AT₁ 受体存在共连接, 抑制 GRK4 表达后增加 GRK4 与 AT₁ 受体之间的共连接。结论 GRK4 能够调控大鼠胸主动脉平滑肌细胞 AT₁ 受体蛋白表达及其磷酸化状态, 该调节作用可能与两者的共连接有关。

[关键词] G 蛋白偶联受体 4; 血管紧张素 II 1 型受体; 血管平滑肌细胞; 原发性高血压

[中图分类号] R322.12; R329.26; R345

[文献标志码] A

G protein-coupled receptor kinase 4 regulates expression and phosphorylation status of AT₁ receptor in rat vascular smooth muscle cells

Liu Li^{1,2}, Yang Jian^{2,3}, Chen Caiyu², Wang Wei^{1,2}, Zhou Yongqiao^{1,2}, Han Yu², He Duofen², Zhou Lin², Zeng Chunyu² (¹Department of Cardiology, First Affiliated Hospital, Shantou University Medical College, Shantou, Guangdong Province, 515041; ²Chongqing Institute of Cardiovascular Diseases, ³Department of Nutrition, Institute of Surgery Research, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400042, China)

[Abstract] **Objective** To determine the effect of G protein-coupled receptor kinase 4 (GRK4) on angiotensin II type 1 (AT₁) receptor in rat vascular smooth muscle cells by siRNA against GRK4. **Methods** S-P immunohistochemistry was used to detect the expression of GRK4 in SD rat ileocolic artery sample. Western blotting were employed to detect the expression of GRK4 and AT₁ receptor in A10 cells, an embryonic thoracic aortic smooth muscle cell line from normotensive Berlin-Druckrey IX, with or without RNA interference. The phosphorylation of AT₁ receptor and the interaction between GRK4 and AT₁ receptor were determined by co-immunoprecipitation. **Results** GRK4 protein was expressed in rat aortic smooth muscle cells. GRK4 siRNA interference inhibited GRK4 protein expression and AT₁ receptor expression in A10 cells ($P < 0.05$), while the AT₁ receptor phosphorylation was enhanced ($P < 0.05$). There was co-immunoprecipitation between GRK4 and AT₁ receptor, which was increased after GRK4 siRNA interference. **Conclusion** GRK4 regulates AT₁ receptor expression and phosphorylation, which may be related with the linkage between GRK4 and AT₁ receptor.

[Key words] G protein-coupled receptor kinase 4; AT₁ receptor; vascular smooth muscle cells; hypertension

Supported by the National Basic Research Program (973 Program, 2012CB517801), the National Natural Science Foundation of China (31130029, 81070559, 81100500), the National Natural Science Foundation for Distinguished Young Scholars of China (30925018), and the Natural Science Foundation for Distinguished Young Scholars of Chongqing (CSTC2009BA5044). Corresponding author: Zeng Chunyu, Tel: 86-23-68757801, E-mail: chunyu.zeng01@163.com

[基金项目] 国家重点基础研究发展计划(973 计划, 2012CB517801); 国家自然科学基金(31130029, 81070559, 81100500); 国家杰出青年科学基金(30925018); 重庆市杰出青年科学基金(CSTC2009BA5044)

[通信作者] 曾春雨, 电话: (023)68757801; E-mail: chunyu.zeng01@163.com

原发性高血压(essential hypertension, EH)及其并发症严重威胁着人类健康。高血压对血管的主要影响表现为血管中层平滑肌细胞增殖、管壁增厚、管腔狭窄。肾素-血管紧张素系统(renin angiotensin system, RAS)的激活参与动脉粥样硬化的形成,其中血管紧张素II(angiotensin II, Ang II)尤为重要^[1]。AT₁受体是Ang II的主要受体,其介导的血管收缩、促血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cells, VSMCs)增殖等效应在高血压发生、发展中发挥重要作用^[2]。G蛋白偶联受体激酶(G protein-coupled receptor kinases, GRKs)是一种丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,共有7个类型,在所有的GRKs亚型中,只有GRK4的功能改变先于EH发生而发生^[3-4]。既往有研究发现肾脏中GRK4对AT₁受体具有调节作用^[5]。但是,血管中GRK4是否能够调节AT₁受体并不清楚。因此,本研究利用大鼠胸主动脉平滑肌细胞株(A10细胞株)为研究对象,观察抑制A10细胞株GRK4表达后,AT₁受体的表达改变,并进一步研究其作用机制。

1 材料与方法

1.1 材料

A10细胞株由美国Georgetown大学Dr. Pedro A. Jose实验室提供^[6]。DMEM高糖培养基购自美国GIBCO公司;GRK4抗体、AT₁受体抗体、 β -actin抗体、琼脂糖磁珠A均购自美国Santa Cruz公司;磷酸化苏氨酸抗体购自美国Cell signaling technology公司;大鼠GRK4 siRNA合成于广州锐博公司合成,序列为5'-CCAAGAGAGUACAUCAUdTT-3';Lipofectamine 2000购自美国invitrogen公司。

1.2 方法

1.2.1 免疫组织化学检测大鼠回结肠动脉中层平滑肌组织GRK4受体的表达 采用过氧化物酶标记的链霉素卵白素免疫组化染色法检测平滑肌组织GRK4蛋白表达。取3只10周龄250g雄性SD大鼠回结肠动脉,迅速置于4%多聚甲醛溶液中固定组织30min,以1%BSA室温封闭1h,1:100稀释GRK4一抗,37℃孵育30min,PBS缓冲液漂洗,最后使用DAB显色剂进行显色1~2min。

1.2.2 细胞培养与转染 A10细胞株来源于大鼠胚胎鼠的胸主动脉,既往试验已证实A10细胞株与活体胸主动脉平滑肌细胞具有相同特征^[7]。细胞培养基为含10%胎牛血清的DMEM高糖培养基。转染前24h种板,待细胞生长达到50%~60%融合时换无血清培养基2h后转染。具体方法:①将5 μ l siRNA加入245 μ l不含抗生素的无血清DMEM稀释,室温孵育5min;②用240 μ l不含抗生素的无血清DMEM稀释10 μ l Lipofectamine 2000并混匀后,室温孵育5min;③将①和②中混合液进行混合即转染混合液,室温孵育15min;④将6孔板中培养基换用2ml不含抗生素的无菌无血清DMEM,加入转染混合液,轻柔混匀,置于CO₂培养箱中。转染6h后更换为含10%胎牛血清培养基继续培养,培养48h提取蛋白。

1.2.3 免疫印迹检测GRK4和AT₁受体表达 提取细胞总蛋白,采用考马斯亮蓝法测定蛋白质浓度。将50 μ g变性好的蛋白进行SDS-PAGE电泳,利用半干转膜法将蛋白转移至硝酸

纤维素膜,封闭1h,分别与GRK4抗体,AT₁受体抗体(1:400)4℃孵育过夜,TBST洗涤3次 \times 10min,羊抗兔IgG(1:5000)室温孵育1h,TBST洗涤3次 \times 10min,利用增强化学发光法,经X线片曝光、显影、定影。结果经光密度面积分析,与内参照 β -actin产物条带的比值作为相对含量。

1.2.4 免疫共沉淀观察GRK4和AT₁受体的共连接以及AT₁受体磷酸化程度 常规方法提取细胞质总蛋白。实验样本经裂解液处理1h,4℃条件下离心30min,300 μ g细胞质总蛋白和AT₁受体抗体4℃过夜,再与琼脂糖磁珠A4℃作用2h。免疫沉淀物离心,裂解液洗涤3min \times 3次,洗涤后的沉淀颗粒在样本缓冲液中煮沸10min,进行免疫印迹,免疫印迹抗体为GRK4或磷酸化苏氨酸。为确定检查方法的特异性,正常的兔IgG,GRK4抗体代替AT₁受体抗体或磷酸化苏氨酸抗体代替作为阴性和阳性对照^[4]。

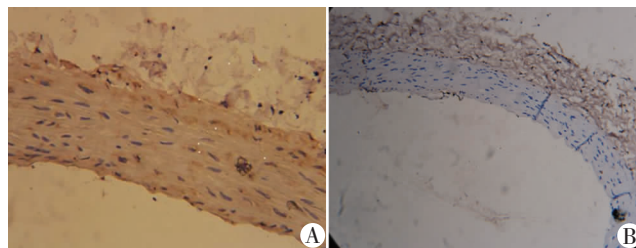
1.3 统计学方法

计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间使用t检验,两组以上的比较采用ANOVA法进行统计分析。

2 结果

2.1 大鼠动脉中层平滑肌细胞GRK4蛋白表达

我们以大鼠肾脏近曲小管作为阳性对照以未加GRK4抗体的大鼠血管平滑肌组织染色为阴性对照,利用免疫组织化学方法,我们观察到高倍镜下阳性细胞的细胞膜和细胞质染成黄褐色,提示大鼠中层动脉平滑肌组织中具有GRK4蛋白的表达。

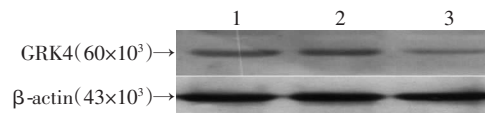


A:平滑肌细胞GRK4阳性表达(S-P \times 200);B:平滑肌细胞GRK4阴性对照(S-P \times 100)

图1 倒置相差显微镜下观察大鼠动脉中层平滑肌细胞GRK4蛋白免疫组化染色阳性表达

2.2 GRK4 siRNA干扰A10细胞后,其蛋白表达的改变

我们利用GRK4 siRNA(50nmol/L)转染A10细胞后,观察其对GRK4表达的抑制效应。免疫印迹结果显示siRNA干扰后,干扰组的GRK4蛋白表达量明显低于对照组[空白对照:(0.87 \pm 0.06),阴性siRNA组:(0.83 \pm 0.05),阳性siRNA组:(0.28 \pm 0.07), $P < 0.05$, $n = 6$],提示siRNA发挥了良好阻断作用,能够有效抑制GRK4的蛋白表达(图2)。



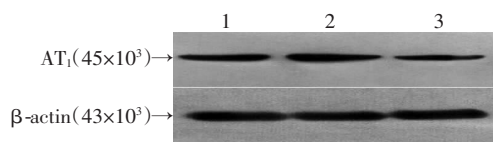
1:空白对照;2:阴性siRNA组;3:阳性siRNA组

图2 GRK4 siRNA干扰A10细胞后的GRK4蛋白表达

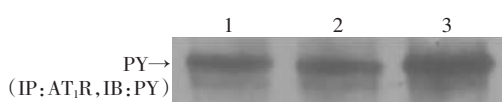
2.3 GRK4 siRNA干扰A10细胞后,AT₁受体蛋白和AT₁受体磷酸化的改变

我们进一步研究了A10细胞中GRK4蛋白表达被抑制后,

AT₁受体蛋白表达和 AT₁受体磷酸化水平的改变。免疫印迹结果显示:siRNA 干扰 GRK4 蛋白表达后,AT₁受体的蛋白表达也明显降低[空白对照:(0.82 ± 0.08),阴性 siRNA 组:(0.78 ± 0.08),阳性 siRNA 组:(0.38 ± 0.10),*P* < 0.05, *n* = 6](图3)。同时,免疫沉淀方法观察 GRK4 表达被阻断后,AT₁受体磷酸化水平有所增强[空白对照:(28.99 ± 3.56),阴性 siRNA 组:(29.09 ± 1.91),阳性 siRNA 组:(40.44 ± 5.20),*n* = 3, *P* < 0.05](图4)。



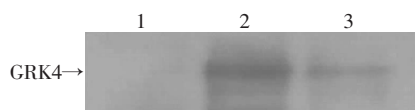
1:空白对照;2:阴性 siRNA 组;3:阳性 siRNA 组
图3 GRK4 siRNA 干扰 A10 细胞,AT₁受体表达的变化



1:空白对照;2:阴性 siRNA 组;3:阳性 siRNA 组
图4 GRK4 siRNA 干扰 A10 细胞,AT₁受体磷酸化程度的改变

2.4 GRK4 和 AT₁受体之间在 A10 细胞内的相互作用

我们提取 A10 细胞的细胞质总蛋白,分别用 IgG 抗体、GRK4 抗体、AT₁抗体进行免疫沉淀,并进行 Western blot 检测。结果显示 IgG 进行免疫沉淀后,未检测到 GRK4 表达(阴性对照);用 GRK4 和 AT₁受体进行免疫沉淀后检测到 GRK4 表达(IgG 抗体:2.46,GRK4 抗体:80.38,AT₁抗体:17.07)(图5),这种连接作用有可能参与了 GRK4 对 AT₁受体的调控。



1:IgG 抗体;2:GRK4 抗体;3:AT₁抗体
图5 A10 细胞上 GRK4 和 AT₁受体的免疫共沉淀

3 讨论

EH 的形成受到神经系统和体液调节系统等多种因素的调节,RAS 系统是体液调节系统中的重要因素。Ang II 是 RAS 系统的最主要效应因子,据报道 Ang II 受体分为 AT₁、AT₂、AT₃和 AT₄四种亚型^[8],其中 AT₁受体亚型介导了 Ang II 主要经典效应,其中对 VSMCs 的短期作用表现为血管收缩,长期作用则促进 VSMCs 增殖和肥厚,这些机制被认为参与了血管增厚和硬化等病理生理过程^[8]。此外,Ang II 通过 AT₁受体还可以诱导原癌基因表达,增强心肌收缩力、促醛固酮及儿茶酚胺释放等^[9]。

GRKs 是一类丝氨酸/苏氨酸激酶,共有 7 个类型。人的 GRK4 在睾丸、肾脏和脑组织中均有表达^[10],但是血管中是否存在并不清楚。本实验通过免疫组化证实大鼠血管平滑肌中存在 GRK4 蛋白表达。既往研究发现 GRK4 功能改变先于 EH 发生而发生,

与高血压密切相关。GRK4 基因所在的染色体部位(4p16.3)与 EH 的发生关系密切^[11];EH 状态下,肾脏 GRK4 活性明显升高^[5]。GRK4 作为一种激酶,主要生理功能是磷酸化 GPCRs,如肾脏中,AT₁受体、多巴胺受体、内皮素受体同属于 GPCRs,当 GRK4 活性升高时,这些受体功能都发生相应改变^[3,12]。

Jose 等^[6]发现高血压大鼠中 GRK4 和 AT₁受体的表达均升高;给予 GRK4 或 AT₁受体反义寡核苷酸可以增加尿钠排泄量和尿量。我们实验室以往研究发现血管平滑肌细胞有 GRK4 蛋白的表达,我们猜想血管上 GRK4 对 AT₁受体也有类似的调控作用。实验中我们用 siRNA 技术抑制 GRK4 蛋白表达后观察 AT₁受体表达的变化,我们将 GRK4 siRNA 转染 A10 细胞,观察到干扰组 GRK4 蛋白表达量明显低于对照组,证实 siRNA 发挥了良好阻断作用。进一步,我们发现 siRNA 阻断 GRK4 蛋白表达后,A10 细胞中 AT₁受体蛋白表达也得到明显降低,这提示在血管中沉默了 GRK4 后,同样也很可能通过降低了 AT₁受体的表达从而减轻其介导的病理生理功能。我们既往实验已经证实当 GRK4 表达量增高时,AT₁受体的表达同时也升高,这在另一方面证实了 GRK4 和 AT₁受体表达呈正相关性。

据报道 AT₁受体有自发活性,当 Ang II 刺激后其活性明显增强,被活化的 AT₁受体被 PKC 等激酶磷酸化,使其所介导的信号通路失敏^[13-14]。假设 GRK4 影响 AT₁受体活性状态介导的生理功能,那么 GRK4 是否也会影响 AT₁受体的磷酸化状态呢?我们既往在肾脏的研究发现,GRK4 活性增加后 AT₁受体磷酸化状态却降低,从而增加了 AT₁受体的敏感性^[15]。同肾脏的研究结果一致,本研究发现抑制 GRK4 表达后 AT₁受体的磷酸化程度增加,AT₁受体的表达量下降。GRK4 和 AT₁受体之间存在连接(免疫沉淀证实),该连接是 GRK4 发挥对 AT₁受体磷酸化影响的基础。我们既往研究发现增加 GRK4 表达可减少 GRK4 与 AT₁受体的连接,因而,减弱了 AT₁受体的磷酸化。本实验从反义核苷酸角度对该结论进行了验证,同样发现,降低 GRK4 表达后可增加 GRK4 与 AT₁受体的连接,从而增加 AT₁受体的磷酸化。GRK4 对 AT₁受体表达(间接机制)和磷酸化(直接机制)的影响机制不一样,因此,得出了看似矛盾却又合理的结果。

综上所述,在 VSMCs 中,当 GRK4 表达降低时,伴随 AT₁受体表达的降低和磷酸化 AT₁受体水平的升高,从另一个方面证实了 GRK4 对 AT₁受体的正向调节作用,提示 GRK4 对 AT₁受体表达和功能的调节在心血管系统疾病的病理生理过程中可能具有重要意义。

参考文献:

[1] Ohishi M, Dusting G J, Fennessy P A, et al. Increased expression and

co-localization of ACE, angiotensin II AT(1) receptors and inducible nitric oxide synthase in atherosclerotic human coronary arteries[J]. *Int J Physiol Pathophysiol Pharmacol*, 2010, 2(2): 111 - 124.

[2] Liu G, Hitomi H, Hosomi N, *et al.* Mechanical stretch potentiates angiotensin II-induced proliferation in spontaneously hypertensive rat vascular smooth muscle cells[J]. *Hypertens Res*, 2010, 33(12): 1250 - 1257.

[3] Zeng C, Eisner G M, Felder R A, *et al.* Dopamine receptor and hypertension[J]. *Curr Med Chem Cardiovasc Hematol Agents*, 2005, 3(1): 69 - 77.

[4] Jose P A, Soares-da-Silva P, Eisner G M, *et al.* Dopamine and G protein-coupled receptor kinase 4 in the kidney: role in blood pressure regulation[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2010, 1802(12): 1259 - 1267.

[5] Yatabe J, Sanada H, Midorikawa S, *et al.* Effects of decreased renal cortical expression of G protein-coupled receptor kinase 4 and angiotensin type 1 receptors in rats[J]. *Hypertens Res*, 2008, 31(7): 1455 - 1464.

[6] Zeng C, Wang D, Yang Z, *et al.* Dopamine D₁ receptor augmentation of D₃ receptor action in rat aortic or mesenteric vascular smooth muscles [J]. *Hypertension*, 2004, 43(3): 673 - 679.

[7] Kimes B W, Brandt B L. Characterization of two putative smooth muscle cell lines from rat thoracic aorta[J]. *Exp Cell Res*, 1976, 98(2): 349 - 366.

[8] 程江华, 杨剑, 于长青 等. 多巴胺 D₄ 受体对血管紧张素 II 介导的血管平滑肌细胞增殖的影响[J]. *第三军医大学学报*, 2010, 32

(20): 2168 - 2171.

[9] De-Bundel D, Smolders I, Vanderheyden P, *et al.* Ang II and Ang IV: unraveling the mechanism of action on synaptic plasticity, memory, and epilepsy[J]. *CNS Neurosci Ther*, 2008, 14(4): 315 - 339.

[10] Jose P A, Eisner G M, Felder R A. Dopamine receptor-coupling defect in hypertension[J]. *Curr Hypertens Rep*, 2002, 4(3): 237 - 244.

[11] Allayee H, de-Bruin T W, Michelle-Dominguez K, *et al.* Genome scan for blood pressure in Dutch dyslipidemic families reveals linkage to a locus on chromosome 4p[J]. *Hypertension*, 2001, 38(4): 773 - 778.

[12] Wang Z, Zeng C, Escano C, *et al.* The role of GRK4gammaA142V in the dysfunction of renal AT1 and D₁ dopamine receptor in genetic hypertension[J]. *Hypertension*, 2005, 46(4): 814.

[13] Kai H, Griendling K K, Lassegue B, *et al.* Agonist-induced phosphorylation of the vascular type 1 angiotensin II receptor[J]. *Hypertension*, 1994, 24(4): 523 - 527.

[14] Miura S, Saku K, Karnik S S. Molecular analysis of the structure and function of the angiotensin II type 1 receptor[J]. *Hypertens Res*, 2003, 26(12): 937 - 943.

[15] Zeng C, Villar V A, Eisner G M, *et al.* G protein-coupled receptor kinase 4: role in blood pressure regulation[J]. *Hypertension*, 2008, 51(6): 1449 - 1455.

(收稿:2011-10-20;修回:2012-01-15)
(编辑 栾 嘉)

(上接 592 页)

综合征、溶血性贫血。治疗经过:予冷沉淀补充纤维蛋白原,抗纤溶,控制血压、心室率等处理后,血红蛋白、纤维蛋白原升高,皮肤黏膜出血表现明显改善。患者高龄,手术治疗风险大,家属要求保守治疗。随访至今患者多次因纤维蛋白溶解综合征致牙龈出血住院,经抗纤溶、补充纤维蛋白原治疗,病情均缓解。目前继续门诊随访,病情稳定。

2 讨论

患者存在皮肤黏膜出血、血浆纤维蛋白原含量明显减低、FDP 水平升高、纤维蛋白碎片 D-二聚体增高,结合血小板正常以及 3P 试验阴性,符合原发型纤维蛋白溶解综合征诊断标准^[1]。患者皮肤黏膜有出血表现,存在发热,网织红细胞比例增多、间接胆红素增高,骨髓象提示红细胞系统增生明显,其贫血原因考虑溶血性贫血,Coombs 试验阴性,自身抗体谱正常,免疫相关性溶血性贫血证据不足;结合存在纤溶亢进,考虑微血管病性溶血性贫血(MHA)可能性较大,但缺少外周血破碎红细胞证据,MHA 尚不能明确。为进一步确定引起纤维蛋白溶解综合征的基础病因,因患者有高血压病,X 线胸片示主动脉型心影增宽,予查胸部 CT 平扫提示:主动脉弓及以下胸主动脉腔内线状高密度影分隔:动脉夹层可能;肺纵膈胸膜 CT 平扫+增强示:(主动脉弓至双肾上极水平)胸腹主动脉腔可见内膜片分隔呈真假双腔:主动脉弓、胸腹主动脉夹层。该患者最后诊断为主动脉夹层并发原发性纤维蛋白溶解综合征、溶血性贫血。

主动脉夹层是主动脉内膜撕裂,循环中的血液渗入主动脉壁中层形成夹层血肿并沿主动脉壁延伸剥离的严重心血管急

症。当中层平滑肌细胞发退变,弹力纤维产生减少和弹力纤维发生囊性坏死时,中层结构受到破坏,其顺应性降低,减弱了主动脉壁对血流切应力的抵抗力,易发生夹层。主动脉壁中层结构的异常,特别是弹力纤维成分的异常,是夹层产生的病理基础^[2]。其常见病因为包括高血压、遗传疾病、创伤、妊娠、梅毒、血管炎和系统性红斑狼疮等,男性较女性多见。临床表现多以突发剧烈胸、腹、背刀割或撕裂样痛,高血压、心血管症状和神经症状以及压迫症状常见^[3]。本例主动脉夹层以原发性纤维蛋白溶解综合征为主要表现较为罕见,且存在皮肤黏膜出血表现,血常规见血小板减少,血浆纤维蛋白原减低,易误诊为弥散性血管内凝血功能障碍(DIC)等血液系统病症。关于主动脉夹层并发原发性纤维蛋白溶解综合征机制尚不清楚,可能与主动脉内膜撕裂形成假腔诱发血栓形成以及组织损伤引发纤维蛋白原等凝血物质消耗有关^[4]。因此,对于纤维蛋白溶解综合征且有高血压病患者,应注意主动脉夹层可能。

参考文献:

[1] 张之南,沈悝. 血液病诊断及疗效标准[M]. 第3版. 北京:科学出版社,2007: 202 - 204.

[2] Tsai T T, Nienaber C A, Eagle K A. Acute aortic syndromes[J]. *Circulation*, 2005, 112(24): 3802 - 3813.

[3] 陈灏珠. 实用内科学[M]. 第12版. 北京:人民卫生出版社, 2005: 1594 - 1595.

[4] Tsai T T, Evangelista A, Nienaber C A, *et al.* Partial thrombosis of the false lumen in patients with acute type B aortic dissection[J]. *N Engl J Med*, 2007, 357(4): 349 - 359.

(收稿:2012-02-15;修回:2012-03-09)
(编辑 王 红)