

论著

文章编号:1000-5404(2013)02-0105-04

川芎嗪通过 Akt 信号通路影响前列腺癌 PC3 细胞的增殖和凋亡

韩娇艳¹, 朱方强², 徐祥³, 黄宏³, 黄文秋¹, 崔文慧¹, 代卉¹, 蒋建新⁴, 王莎莉¹ (400016 重庆, 重庆医科大学神经科学研究中心¹; 400038 重庆, 第三军医大学西南医院肾内科²; 400042 重庆, 第三军医大学大坪医院野战外科研究所: 第一研究室³, 第四研究室⁴, 创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室)

[摘要] 目的 研究盐酸川芎嗪对前列腺癌 PC3 细胞增殖和凋亡的影响及作用机制。方法 0、0.2、0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、3.5 mg/mL 盐酸川芎嗪处理雄激素非依赖性前列腺癌 PC3 细胞, MTT 法检测各组细胞的增殖能力, 荧光显微镜观察细胞核形态学改变, Western blot 检测 Akt 以及下游相关蛋白 mTOR、p70S6 蛋白及蛋白磷酸化的表达, 以及凋亡相关蛋白 Bcl-2 和 Bax 的表达。结果 盐酸川芎嗪能有效抑制前列腺癌 PC3 细胞增殖, 且显示浓度时间依赖性 ($P < 0.05$)。1.5、2.5 mg/mL 的盐酸川芎嗪能够降低 Akt 和 p-Akt 的表达, 进而下调 mTOR、p-mTOR、p70S6 及 p-p70S6 的表达 ($P < 0.05$); 同时下调 Bcl-2、上调 Bax 蛋白的表达 ($P < 0.05$)。结论 Akt 及其下游信号通路介导了盐酸川芎嗪抑制前列腺癌 PC3 细胞增殖及促凋亡作用。

[关键词] 川芎嗪; 前列腺肿瘤; 肿瘤细胞, 培养的; Akt

[中图分类号] R285.5; R730.23; R737.25

[文献标志码] A

Tetramethylpyrazine hydrochloride inhibits proliferation and apoptosis in human prostate cancer PC3 cells through Akt signaling pathway

Han Jiaoyan¹, Zhu Fangqiang², Xu Xiang³, Huang Hong³, Huang Wenqiu¹, Cui Wenhui¹, Dai Hui¹, Jiang Jianxin⁴, Wang Shali¹ (¹Institute of Neuroscience, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016; ²Department of Nephrology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400038; State Key Laboratory of Trauma, Burns and Combined Injury, ³Department 1, ⁴Department 4, Institute of Surgery Research, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400042, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the inhibitory effect of 2,3,5,6-tetramethylpyrazine hydrochloride (TMP) on the proliferation and apoptosis in human prostate cancer PC3 cells and to explore its underlying mechanism. **Methods** Different concentrations of TMP (0, 0.2, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0 and 3.5 mg/mL) was added to treat PC3 cells. MTT assay was performed to test the inhibitory effect on cell proliferation, and fluorescence microscopy was applied to test the nuclear alteration. Western blot assay was used to detect the expression of Akt and the related downstream targets. **Results** TMP inhibited the proliferation in PC3 cells in a dose- and time-dependent manner ($P < 0.05$). TMP of 1.5 and 2.5 mg/mL decreased the protein levels of Akt, p-Akt, as well as the protein level of mTOR, p-mTOR, p70S6, and p-p70S6. Simultaneously, TMP also down-regulated the expression of Bcl-2, and up-regulated that of Bax ($P < 0.05$). **Conclusion** TMP inhibits the proliferation and induces the apoptosis in PC3 cells. Akt and the related downstream targets are involved in this process.

[Key words] tetramethylpyrazine; prostatic neoplasms; tumor cells, cultured; Akt

Supported by the National Basic Research Program (973 Program, 2012CB518104), the Foundation of State Key Laboratories (SKLZZ200907) and the Starting Funds for the Personnel Returning From Overseas of Chongqing Committee of Science and Technology (CSTC2010BB5036). Corresponding author: Wang Shali, E-mail: ypsnali@gmail.com

[基金项目] 国家重点基础研究发展计划(973计划, 2012CB518104); 国家重点实验室基金(SKLZZ200907); 重庆市科委回国人员启动基金(CSTC2010BB5036)

[通信作者] 王莎莉, E-mail: ypsnali@gmail.com

[优先出版] <http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20121207.1023.022.html> (2012-12-07)

前列腺癌是男性泌尿生殖系统常见的恶性肿瘤之一, 近年来发病率呈上升趋势, 严重威胁着老年男性的身心健康。尤其是对内分泌治疗不敏感的激素非依赖性前列腺癌, 始终没有较理想的治疗方法, 日益成为临床亟待解决的难题。中药对肿瘤的治疗有独特的疗

效,近年来有研究^[1-5]发现川芎嗪具有抗肿瘤,抑制肿瘤转移,及逆转肿瘤多药耐药,提高药物敏感性的作用。而PI3K/Akt信号通路常常在人类多种肿瘤中表达失调,调节着肿瘤细胞的增殖和存活,与肿瘤细胞的恶性转化、迁移、黏附、肿瘤血管生成等相关^[6]。因此本研究旨在研究盐酸川芎嗪对激素非依赖型前列腺癌转移灶的细胞——PC3细胞株的作用以及Akt及其下游信号通路在其中的作用。

1 材料与方 法

1.1 细胞株、实验药物和试剂

PC3人前列腺癌细胞株由第三军医大学大坪医院野战外科研究所第一研究室提供;盐酸川芎嗪注射液购自河南辅仁仁庆堂制药有限公司(规格:40 mg/2 mL,批号:1204141);RPMI1640培养基购自美国Hyclone公司,四甲基偶氮唑蓝(MTT)购自Sigma公司,Akt、mTOR、p70S6K、p-Akt(T308)、p-mTOR(Ser2448)、p-p70S6(T421/S424)、Bcl-2、Bax等多克隆抗体购自Cell Signaling公司,HRP标记的山羊抗兔IgG二抗购自中杉金桥,Hoechst33342购自美国Sigma公司。

1.2 方 法

1.2.1 MTT法检测PC3细胞的增殖 取对数生长期状态良好的PC3细胞,0.25%胰蛋白酶溶液消化,按每孔 5×10^3 个细胞接种于96孔培养板中。常规培养24 h后,吸弃培养液和未贴壁细胞,更换为含不同浓度盐酸川芎嗪的培养液,使终浓度依次为0、0.2、0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、3.5 mg/mL,空白对照组只加等量的细胞和培养液,同时设置本底组为只加不含细胞的培养基,每个浓度设5个复孔。分别培养48、72 h后每孔加入MTT溶液(5 mg/mL)20 μ L,37 $^{\circ}$ C、5% CO₂培养箱孵育4 h后弃上清,每孔加入150 μ L二甲基亚砷,摇床轻摇10 min,在酶联免疫检测仪上测定各孔光密度值[D(490)]。对照组细胞存活率记为100%,实验组按公式计算:细胞增殖率 = $[D(490)_{\text{实验组}} - D(490)_{\text{本底组}}] / [D(490)_{\text{对照组}} - D(490)_{\text{本底组}}] \times 100\%$ 。

1.2.2 荧光显微镜观察细胞凋亡核改变 将PC3细胞接种到载玻片上,不同浓度的盐酸川芎嗪刺激48 h后,PBS冲洗3遍,4%多聚甲醛固定15 min,PBS冲洗3次,加入Hoechst33342避光染色15 min,PBS冲洗3次,在荧光显微镜下观察细胞核变化、摄像。

1.2.3 细胞总蛋白的提取与Western blot分析 不同浓度盐酸川芎嗪处理细胞45 min和48 h后收集细胞,用冰冷的PBS洗3遍,加适量含蛋白酶抑制剂的RIPA裂解液冰上静置裂解30 min。接着将裂解液转移至EP管,4 $^{\circ}$ C、12 000 r/min离心

15 min,将蛋白上清液转至新的EP管,测定浓度,分装。各组取等量蛋白质,经8%、10%、15% SDS-PAGE分离后,半干转膜至PVDF膜上,然后封闭,之后与一抗结合,4 $^{\circ}$ C摇床过夜;TPBS洗涤后与二抗结合反应,同上洗涤,用ECL发光显色后在X线洗片机(HQ-320XT)上曝光检测,采用Quantity One 4.6.2软件对图像进行光密度值分析,并计算目的蛋白与 β -actin蛋白的比值。

1.3 统计学分析

采用SPSS 17.0统计软件,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较用单因素方差分析。

2 结 果

2.1 MTT法检测盐酸川芎嗪对前列腺癌PC3细胞增殖的影响

PC3细胞在不同浓度盐酸川芎嗪处理48 h和72 h后增殖明显被抑制,且呈剂量时间依赖关系($P < 0.05$)。盐酸川芎嗪处理PC3细胞48 h时的IC₅₀大约是2.5 mg/mL;盐酸川芎嗪处理PC3细胞72 h时的IC₅₀大约是2 mg/mL。据此后续实验取1.5、2.5 mg/mL这两个处理浓度和48 h这个处理时间。见表1。

表1 不同浓度盐酸川芎嗪对PC3细胞增殖的影响 ($n=5, \bar{x} \pm s$)

组别	48 h	72 h
空白对照组	0.755 2 \pm 0.007 9	1.223 7 \pm 0.001 2
0.20 mg/mL 盐酸川芎嗪处理组	0.737 8 \pm 0.009 6 ^a	1.158 2 \pm 0.007 4 ^a
0.50 mg/mL 盐酸川芎嗪处理组	0.605 4 \pm 0.006 3 ^a	1.092 0 \pm 0.002 6 ^a
1.00 mg/mL 盐酸川芎嗪处理组	0.537 1 \pm 0.008 5 ^a	0.956 6 \pm 0.002 7 ^a
1.50 mg/mL 盐酸川芎嗪处理组	0.501 6 \pm 0.008 0 ^a	0.742 3 \pm 0.012 3 ^a
2.00 mg/mL 盐酸川芎嗪处理组	0.437 7 \pm 0.014 0 ^a	0.620 4 \pm 0.006 7 ^a
2.50 mg/mL 盐酸川芎嗪处理组	0.378 2 \pm 0.011 3 ^a	0.458 0 \pm 0.006 4 ^a
3.00 mg/mL 盐酸川芎嗪处理组	0.267 2 \pm 0.012 9 ^a	0.346 8 \pm 0.001 7 ^a
3.50 mg/mL 盐酸川芎嗪处理组	0.198 4 \pm 0.007 5 ^a	0.286 2 \pm 0.005 3 ^a

a: $P < 0.05$,与空白对照组比较

2.2 荧光显微镜观察PC3细胞凋亡的核形态改变

对照组的细胞核呈现弥散均匀的蓝色荧光,1.5、2.5 mg/mL盐酸川芎嗪组的细胞核与其相比呈亮蓝色、染色质浓缩、边缘化,有部分细胞核裂解成碎块。提示盐酸川芎嗪可以诱发PC3细胞凋亡,且具浓度依赖性($P < 0.05$)。见图1。

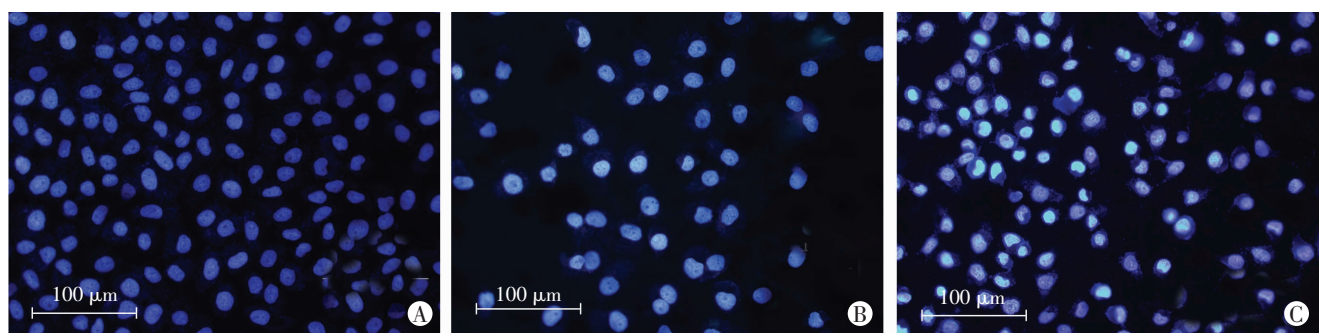
2.3 盐酸川芎嗪对PC3细胞Akt及其下游蛋白合成相关蛋白mTOR和p70S6表达的影响

不同浓度盐酸川芎嗪处理PC3细胞48 h后mTOR和p70S6K的表达减少,且刺激45 min后p-mTOR、p-p70S6K的表达也明显减少($P < 0.05$),这与上游Akt及p-Akt趋势一致。提示盐酸川芎嗪可能通过抑制Akt及其活化进而抑制了mTOR信号通路蛋白的表达及活化。见表2、图2。

表2 各组PC3细胞Akt、p-Akt、mTOR、p-mTOR、p70S6、p-p70S6蛋白相对表达 ($n=5, \bar{x} \pm s$)

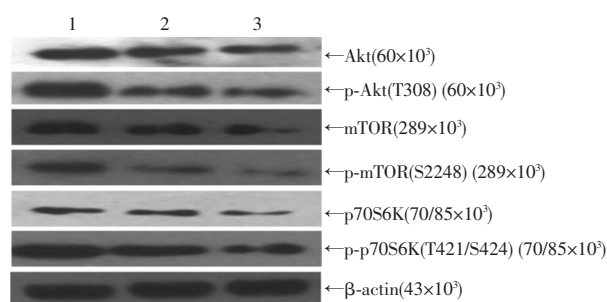
组别	Akt	p-Akt	mTOR	p-mTOR	p70S6	p-p70S6
空白对照组	0.965 5 \pm 0.003 0	1.110 9 \pm 0.001 2	0.925 6 \pm 0.003 7	0.776 4 \pm 0.002 8	0.657 9 \pm 0.001 6	1.225 3 \pm 0.002 4
1.5 mg/mL 盐酸川芎嗪处理组	0.712 3 \pm 0.000 6 ^a	0.862 6 \pm 0.004 5 ^a	0.767 1 \pm 0.003 4 ^a	0.415 3 \pm 0.001 6 ^a	0.492 6 \pm 0.000 5 ^a	1.073 6 \pm 0.007 4 ^a
2.5 mg/mL 盐酸川芎嗪处理组	0.565 2 \pm 0.002 6 ^a	0.501 4 \pm 0.001 3 ^a	0.426 1 \pm 0.005 2 ^a	0.256 7 \pm 0.006 8 ^a	0.322 7 \pm 0.000 9 ^a	0.725 3 \pm 0.004 2 ^a

a: $P < 0.05$,与空白对照组比较



A:空白对照组;B:1.5 mg/mL 盐酸川芎嗪处理组;C:2.5 mg/mL 盐酸川芎嗪处理组

图1 Hoechst33342 染色观察不同浓度川芎嗪处理 PC3 细胞后的细胞核改变

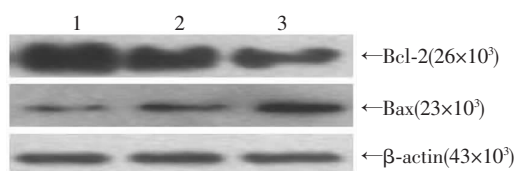


1:空白对照组;2:1.5 mg/mL 盐酸川芎嗪处理组;3:2.5 mg/mL 盐酸川芎嗪处理组

图2 Western blot 检测各组 PC3 细胞 Akt、P-Akt、mTOR、p-mTOR、p70S6、p-p70S6 的蛋白表达

2.4 盐酸川芎嗪对 PC3 细胞凋亡相关蛋白 Bcl-2 和 Bax 表达的影响

1.5、2.5 mg/mL 的盐酸川芎嗪可下调调亡蛋白 Bcl-2 的表达,同时上调促调亡蛋白 Bax 的表达,从而促进 PC3 细胞调亡。见图3、表3。



1:空白对照组;2:1.5 mg/mL 盐酸川芎嗪处理组;3:2.5 mg/mL 盐酸川芎嗪处理组

图3 Western blot 检测各组 PC3 细胞 Bcl-2、Bax 的蛋白表达

表3 各组 PC3 细胞 Bcl-2、Bax 蛋白相对表达 (n=5, $\bar{x} \pm s$)

组别	Bcl-2	Bax
空白对照组	2.734 4 ± 0.003 5	0.401 3 ± 0.000 9
1.5 mg/mL 盐酸川芎嗪处理组	1.905 1 ± 0.004 2 ^a	0.543 7 ± 0.000 9 ^a
2.5 mg/mL 盐酸川芎嗪处理组	1.554 2 ± 0.003 7 ^a	1.003 6 ± 0.004 5 ^a

a: $P < 0.05$, 与空白对照组比较

3 讨论

PC3 是源于远处淋巴结中激素非依赖型前列腺癌转移灶的细胞,没有雄激素受体 AR mRNA 和蛋白的表达,所以雄激素非依赖型前列腺癌的常规激素治疗

往往没有明显作用。因此,探寻更好的治疗方法是临床上亟待解决的问题。

川芎嗪是中药川芎根茎中的生物碱单体,具有抗氧化、钙拮抗、抑制血小板聚集、改善微循环、抗血栓改善血液流变学、调节免疫功能等广泛的药理作用^[7]。近年来川芎嗪抗肿瘤的作用日益受到重视,据报道川芎嗪具有抑制白血病、乳腺癌等多种恶性肿瘤的作用^[8-9],但对激素非依赖型前列腺癌转移灶的细胞是否有作用鲜见报道。我们在实验中观察到不同浓度的盐酸川芎嗪能有效地直接抑制 PC3 细胞增殖,增加其调亡,且具有明显时间和剂量依赖性。当盐酸川芎嗪作用 48 h 时,PC3 细胞的 IC₅₀ 是 2.5 mg/mL,当盐酸川芎嗪作用 72 h 时,PC3 细胞的 IC₅₀ 是 2 mg/mL ($P < 0.05$)。

PI3K (phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K)/Akt (Serine/threonine Kinase, Akt) 信号通路参与细胞增殖、分化、调亡等多种功能的调节,Akt 处于这一通路的中心环节。近年来研究发现,Akt 可以通过磷酸化作用激活或抑制多条信号通路,如 Bcl-2/Bax、mTOR、P21、Caspase9、NF-kB、Forkhead、Par-4 等,在肿瘤发生、发展、浸润等过程中也凸现出重要作用。有研究^[10]报道 Akt 在前列腺癌中高表达,其表达的强度与血清前列腺特异性抗原呈正相关。p-Akt 的表达水平与肿瘤的复发有关,并认为 Akt 可以作为其生物标记物^[11]。本研究发现盐酸川芎嗪处理之后 Akt 及 p-Akt 的蛋白水平明显下降,说明 PI3K/Akt 信号通路参与前列腺癌发生、发展的调控,盐酸川芎嗪的抗前列腺癌作用是与抑制 Akt 的活性,从而下调其下游信号通路密切相关的。

哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mammalian target of rapamycin, mTOR)是一种丝/苏氨酸蛋白激酶,在细胞生长、增殖、分化、细胞周期调控等多个方面起到重要作用,也是 Akt 作用的重要下游通路。近年来发现在多种恶性肿瘤中存在 mTOR 信号途径的异常激活,激

活后的 mTOR 可调节核蛋白体 p70S6K (S6K1), 继而激活的 S6K1 能增强含有 5'-末端寡嘧啶区 (TOP) 的 mRNA 的翻译, 促进蛋白质的合成, 最终促进肿瘤细胞的生长, 增加其生存时间。mTOR 信号通路蛋白除了 PTEN 的表达下降外, 其余都高表达于前列腺癌发展的不同阶段^[11] 及癌前病变^[12]。也有研究^[13] 发现 mTOR 抑制剂能够增加传统化疗药物紫杉醇在激素非依赖性前列腺癌中的敏感性, 二者联合应用可阻止细胞周期在 G₀/G₁ 期。本研究发现盐酸川芎嗪作用 PC3 细胞株后, mTOR 及其下游 p70S6K 蛋白以及蛋白的磷酸化表达明显减弱, 这些变化与 Akt 的变化同步 ($P < 0.05$)。因此, 我们推测盐酸川芎嗪可能通过降低 Akt 蛋白及蛋白磷酸化的表达, 继而下调下游 mTOR、p70S6K 的表达和磷酸化, 从而减少 PC3 细胞蛋白合成, 抑制 PC3 细胞的增殖, 发挥了中药川芎嗪抑制肿瘤细胞生长的作用。

Bcl-2 家族蛋白是在细胞凋亡过程中起关键性作用的一类蛋白质, 也是 Akt 作用的另一关键下游靶标^[14-15]。在线粒体膜上, Bcl-2 家族蛋白通过与其他凋亡蛋白的协同作用, 调控线粒体结构与功能的稳定性, 发挥着细胞凋亡“主开关”的作用。Bcl-2 家族包括抗凋亡蛋白 Bcl-2 和促凋亡蛋白 Bax 等。Bax 蛋白在正常细胞中存在于细胞质中, 当受到一系列死亡信号刺激后, 促凋亡蛋白产生增多, 促凋亡蛋白 Bax 与 Bid 或 Bim 相互作用后形成插入线粒体膜的蛋白孔道, 细胞色素 C 释放, 在 ATP 或 dATP 作用下, 与凋亡水解蛋白酶激活因子 Apaf-1 及胱天蛋白酶-9 共同组成凋亡体, 诱发细胞凋亡^[16]。因此, Bcl-2 家族促/抗凋亡蛋白的平衡决定细胞是否凋亡的最终命运。而激活的 Akt 可定位于线粒体、内质网及细胞核的细胞器内, 与其特异性底物相互作用, 通过调节抗/促凋亡蛋白的平衡, 调节细胞周期和细胞存活。本研究发现川芎嗪作用 PC3 后, 其 Akt 蛋白和蛋白的磷酸化水平都明显下调, 同时伴有抗凋亡蛋白 Bcl-2 的下调和促凋亡蛋白 Bax 的上调, 以及 PC3 细胞的大量凋亡 ($P < 0.05$)。因此, 我们推测盐酸川芎嗪可能通过抑制 Akt 的活性, 使其抗/促凋亡信号发生变化, 激活凋亡信号, 促进前列腺癌细胞的凋亡, 起到杀灭肿瘤细胞的作用。

综上所述, 盐酸川芎嗪可以抑制前列腺癌 PC3 细胞的增殖, 促进其凋亡, 其机制可能与盐酸川芎嗪下调 PC3 细胞 Akt 蛋白以及蛋白的磷酸化的表达及活化, 继而抑制细胞增殖与存活通路, 启动细胞凋亡通路相关。

参考文献:

- [1] Yu K, Chen Z, Pan X, *et al.* Tetramethylpyrazine-mediated suppression of C6 gliomas involves inhibition of chemokine receptor CXCR4 expression[J]. *Oncol Rep*, 2012, 28(3): 955-960.
- [2] Zheng C Y, Xiao W, Zhu M X, *et al.* Inhibition of cyclooxygenase-2 by tetramethylpyrazine and its effects on A549 cell invasion and metastasis[J]. *Int J Oncol*, 2012, 40(6): 2029-2037.
- [3] Chen L, Lu Y, Wu J M, *et al.* Ligustrazine inhibits B16F10 melanoma metastasis and suppresses angiogenesis induced by Vascular Endothelial Growth Factor[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2009, 386(2): 374-379.
- [4] Yin J, Yu C, Yang Z, *et al.* Tetramethylpyrazine inhibits migration of SKOV3 human ovarian carcinoma cells and decreases the expression of interleukin-8 *via* the ERK1/2, p38 and AP-1 signaling pathways[J]. *Oncol Rep*, 2011, 26(3): 671-679.
- [5] Zhang Y, Liu X, Zuo T, *et al.* Tetramethylpyrazine reverses multidrug resistance in breast cancer cells through regulating the expression and function of P-glycoprotein[J]. *Med Oncol*, 2012, 29(2): 534-538.
- [6] 张丹丹, 李庆林. PI3K/Akt/mTOR 信号通路与肿瘤[J]. *安徽医药*, 2012, 16(3): 281-283.
- [7] 王生, 赵杨, 陶丽, 等. 川芎嗪对肿瘤介导的血液高凝的影响[J]. *中国药理学通报*, 2012, 28(5): 709-715.
- [8] Wu Y, Xu Y, Shen Y, *et al.* Tetramethylpyrazine potentiates arsenic trioxide activity against HL-60 cell lines[J]. *Braz J Med Biol Res*, 2012, 45(3): 187-196.
- [9] 舒敬德, 杨君, 蒋国勤, 等. 川芎嗪对乳腺癌细胞株 MDA-MB-231 增殖及凋亡的影响[J]. *肿瘤学杂志*, 2011, 17(2): 133-135.
- [10] Liao Y, Grobholz R, Abel U, *et al.* Increase of AKT/PKB expression correlates with gleason pattern in human prostate cancer[J]. *Int J Cancer*, 2003, 107(4): 676-680.
- [11] Kremer C L, Klein R R, Mendelson J, *et al.* Expression of mTOR signaling pathway markers in prostate cancer progression[J]. *Prostate*, 2006, 66(11): 1203-1212.
- [12] Figlin R A, Brown E, Armstrong A J, *et al.* NCCN Task Force Report: mTOR inhibition in solid tumors[J]. *J Natl Compr Canc Netw*, 2008, 6(Suppl 5): S1-S22.
- [13] 夏金生, 陈先国, 庄乾元, 等. 哺乳动物雷帕霉素靶蛋白抑制剂对前列腺癌激素非依赖型细胞株化疗敏感性的影响[J]. *中华男科学杂志*, 2009, 15(7): 617-620.
- [14] 陈兆波, 刘春艳, 倪娜娜, 等. NKX3. 1 下调前列腺癌 PC-3 细胞中抗凋亡基因 bcl-2 的表达[J]. *中国病理生理杂志*, 2011, 27(10): 1902-1906.
- [15] 周炜. 前列腺增生及前列腺癌组织细胞增殖和凋亡与 Bcl-2 和 Bax 基因表达的关系[J]. *广东医学*, 2012, 33(5): 648-650.
- [16] Tsuruta F, Masuyama N, Gotoh Y. The phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)-Akt pathway suppresses Bax translocation to mitochondria[J]. *J Biol Chem*, 2002, 277(16): 14040-14047.

(收稿:2012-07-29;修回:2012-10-29)

(编辑 栾嘉)