文章编号:1000-5404(2014)02-0125-05

论著

人参皂苷 Rg1 抑制白血病细胞 K562 增殖并诱导分化的分子机制

柯大智[1],王红宁[2],陈地龙[2],顾恒伟[2],王亚平[2],王建伟[2],龙 轩[3],李春莉[4],罗春燕[5] (400016 重庆,重庆医科大学:附属第二医院老年病科[1],基础医学院组织学与胚胎学教研室[2],护理学院[3],生命科学研究院[4];401320 重庆,重庆市护士学校[5])

[摘要] **目的** 研究人参皂苷的重要单体 Rg1 对人白血病细胞 K562 的增殖抑制作用并诱导其向成熟分化的分子机制。**方法** 取对数生长期 K562 细胞,分设人参皂苷 Rg1 组和常规培养组,以流式细胞仪检测 24、48、72 h Rg1 对 K562 细胞增殖的影响;Wright's 染色测定细胞形态和酶标仪测定血红蛋白合成来观察 Rg1 作用 24、48、72 h 后 K562 细胞向成熟细胞分化的特征;激光共聚焦显微镜检测 Rg1 作用 48 h 对 K562 细胞 STAT5 蛋白分布的影响;Western blot 法检测 Rg1 作用 24、48、72 h 对 K562 细胞 STAT5 蛋白表达的影响。**结果** 流式细胞仪检测提示 Rg1 作用后 K562 细胞 S 期比例增加,48 h 达高峰($P<0.05$);酶标仪测定显示 Rg1 作用后,K562 细胞合成血红蛋白(Hb)的量与对照组相比具有显著性提高($P<0.05$);Wright's 染色显示经 Rg1 诱导后,K562 细胞体积缩小,细胞核直径减小,细胞核和细胞质的比例降低,细胞向成熟方向分化;激光共聚焦显微镜观察显示经 Rg1 诱导后,K562 细胞细胞质内的 STAT5 荧光强度增加,而细胞核内 STAT5 荧光强度减弱;Western blot 法检测显示 Rg1 作用 K562 细胞后,细胞质内 STAT5 的表达水平增加,细胞核内 STAT5 的表达水平减少,作用 48 h 变化最明显。**结论** 人参皂苷单体 Rg1 可抑制人白血病细胞 K562 增殖并诱导其向成熟方向分化;Rg1 改变 K562 细胞内 STAT5 的分布和减少 K562 胞核中 STAT5 的表达,这可能是 Rg1 抑制 K562 细胞增殖并诱导其分化的作用机制之一。

[关键词] 人参总皂苷单体 Rg1;K562 细胞;增殖抑制;诱导分化;STAT5
[中图法分类号] R285.5;R730.23;R733.7 [文献标志码] A

Molecular mechanism of ginsenoside Rg1 in inhibiting proliferation and inducing differentiation in chronic myelocytic leukemia K562 cells

Ke Dazhi[1], Wang Hongning[2], Chen Dilong[2], Gu Hengwei[2], Wang Yaping[2], Wang Jianwei[2], Long Xuan[3], Li Chunli[4], Luo Chunyan[5] ([1]Department of Geriatric Cardiology, Second Affiliated Hospital, [2]Department of Histology and Embryology, College of Basic Medical Sciences, [3]College of Nursing, [4]College of Life sciences, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016; [5]Chongqing School of Nursing, Chongqing, 401320, China)

[**Abstract**] **Objective** To determine the effect of ginsenoside Rg1 on the proliferation and differentiation of chronic myelocytic leukemia K562 cells and investigate the possible underlying molecular mechanisms. **Methods** K562 cells was treated by 20 μmol/L ginsenoside Rg1 for 24, 48 and 72 h, and flow cytometry (FCM) was used to measure the inhibitory proliferation. Wright's staining and hemoglobinometry were employed to observe the morphology and haemoglobin synthesis to determine the K562 cells differentiation into erythroid cells after the treatment of ginsenoside Rg1. The expression and distribution of signal transducer and activator of transcription 5 (STAT5) in the k562 cells induced by Rg1 were detected by Western blotting and laser confocal microscopy. **Results** There were more K562 cells arrested at S phase after Rg1 treatment, and the cell count reached peak at 48 h ($P<0.05$). There were significantly more hemoglobin in K562 cells induced by gensingnoside Rg1 than the cells without treatment ($P<0.05$). Wright's staining indicated that the K562 cells presented as diminished cell body, reduced nuclear size, abundant cytoplasm, and decreased karyoplasmic ratio, indicating that gensingnoside Rg1 induced the K562 cell differentiation into erythroid cells. Laser confocal microscopy showed the STAT5 green fluorescence was decreased in the cytoplasm, but increased

[基金项目] 国家自然科学基金(81001582);重庆市基础与前沿研究计划项目(CSTC2013jcyjA10051)
[通信作者] 龙 轩,E-mail:xuanlongcq@163.com
李春莉,E-mail:lichunlike@sina.com
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20131107.1613.005.html(2013-11-07)

in the nucleus when induced by Rg1. Western blotting analysis showed the expression of STAT5 was increased in the cytoplasm, and decreased in the nucleus when Rg1 was induced for 48 h. **Conclusion** Ginsenoside Rg1 may inhibit the proliferation in K562 cells and induce the cells differentiation into erythroid cells. Rg1 changes the location of STAT5 and decreases the expression of STAT5 in the nucleus of K562 cells, which might be one of the molecular mechanisms of ginsenoside Rg1 on differentiation of K562 cells.

[**Key words**] ginsenoside Rg1; K562 cells; inhibitory proliferation; differentiation; signal transducer and activator of transcription 5

Supported by the National Natural Science Foundation of China (81001582) and the Project of Basic and Frontier Research of Chongqing (CSTC2013jcyjA10051). Corresponding author: Long Xuan, E-mail: xuanlongcq@163.com; Li Chunli, E-mail: lichunlike@sina.com

白血病是一种造血系统的恶性肿瘤,是由于造血干细胞增殖分化异常而导致的恶性增殖性疾病。目前化疗是治疗白血病的主要手段,但化疗药物的副作用大,复发率高,而且对正常机体免疫与造血系统有极大的损害。某些天然药物具有抗白血病细胞而对正常细胞损伤小的优点,因此,从祖国医学宝库中寻找抑制白血病细胞恶性增殖并诱导其向成熟方向分化的中药诱导分化剂是值得探索的途径之一。

人参是祖国传统医学的"补气生血"要药,人参皂苷是人参中主要的有效药物成分。我们既往研究[1]表明,人参总皂苷能抑制白血病细胞增殖、诱导白血病细胞分化、增加白血病化疗药物的敏感性和逆转耐药等,但具体作用机制仍不清楚;且人参总皂苷成分众多,主要包含 Rb1 (20.48%)、Rb2 (0.13%)、Rc (0.52%)、Rd (0.34%)、Re (2.98%)、Rf (6.53%)、Rg1 (22.16%)、Rg2 (9.61%)、Rg3 (3.0%) 和少量其他人参皂甙(34.25%)[2]。因此,本研究拟选用人参皂苷中含量较多的单体 Rg1,以慢性粒细胞白血病细胞株 K562 为研究对象,探讨其对白血病的作用和促进造血的分子机制,为研制开发诱导白血病分化的天然中药剂提供理论与实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验材料 K562 细胞由重庆医科大学干细胞研究室惠赠。人参皂苷 Rg1 由南京艾斯替么中药研究所提供,纯度为 98.6%。

1.1.2 主要试剂与仪器 RPMI1640 培养基(美国 Gibgo 公司),小牛血清(杭州四季青公司),促红细胞生成素 EPO(美国 Amgen 公司),FITC 标记山羊抗兔 IgG(美国 Santa Cruz 公司),碘化丙啶 PI(美国 Cell Signal 公司),SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)次高分子量标准蛋白质(中国科学院上海生物化学研究所),辣根过氧化物酶标记山羊抗兔 IgG(H + L)(北京中杉金桥生物技术有限公司),细胞质、核蛋白提取液(美国 BioVision 公司),聚丙烯酰胺凝胶试剂盒(碧云天生物公司),抗 STAT5 抗体(相对分子质量为 90×10^3)、抗 Phosphor-STAT5(美国 Cell Signal 公司),抗 β-actin 抗体(相对分子质量为 43×10^3)(美国 Santa 公司),24 孔板、96 孔培养板(美国 Falcon 公司),CO_2 细胞培养恒温箱(美国 Forma Scientific 公司),倒置相差显微镜(日本 Olymus 公司),自动酶标仪(美国 Bio-Rad 公司 550 型),流式细胞仪(美国 Becton-Dickinson 公司),激光共聚焦显微镜(德国徕卡公司)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 K562 细胞于含 RPMI1640 培养基(含 10% 小牛血清, 100 U/mL 青霉素,100 μg/mL 链霉素) 和 2 U/mL EPO 的培养体系中培养,每 2 ~ 3 天更换培养液并传代。然后进行以下检测。

1.2.2 流式细胞仪检测 Rg1 对 K562 细胞周期的影响 取对数生长期的 K562 细胞以 6×10^4/mL 接种于 24 孔板进行细胞周期检测实验。空白对照组:在 1.2.1 所述培养体系中常规培养;Rg1 组:在上述培养体系中加入浓度为 20 μmol/L 的 Rg1[3],每组平行接种 3 个复孔,收集 24、48、72 h 的细胞,用 0.01 mmol/L PBS (pH = 7.2) 洗涤,70% 冰乙醇固定,4 ℃存放。测定前去除固定液,加入 RNA 酶工作液和碘化丙啶 PI,4 ℃染色 30 min,过 300 目滤网后上流式细胞仪,每例标本测定 3×10^4 个细胞,经计算机处理分析得出细胞周期各时相比例。

1.2.3 酶标仪检测 Rg1 对 K562 细胞血红蛋白合成的影响 按 1.2.2 方法分组和培养细胞,收集 24、48、72 h 细胞,采用全细胞蛋白裂解法提取血红蛋白,酶标仪检测光密度值(波长为 414 nm)。根据 $D(414) = 1.0$ 时溶液中的血红蛋白质量浓度为 0.13 g/L[1],计算细胞平均血红蛋白含量。

1.2.4 Wright's 染色检测 Rg1 对 K562 细胞分化的形态变化 按 1.2.2 方法分组和培养细胞,收集细胞 24、48、72 h 细胞,离心涂片,Wright's 染色,光镜下观察细胞形态。

1.2.5 激光共聚焦显微镜观察 Rg1 对 K562 细胞 STAT5 蛋白分布的影响 按 1.2.2 方法分组和培养 48 h 细胞,用 4% 多聚甲醛固定 10 min,PBS 洗涤 3 次,调节细胞浓度为 1×10^6/mL,离心涂片。用 0.5% 小牛血清(PBS 稀释)室温封闭 30 min,加 1‰ Triton PBS 稀释的兔抗人 STAT5 一抗,室温孵育 1 h,4 ℃过夜,PBS 漂洗后加入 FITC 标记的山羊抗兔 IgG 二抗,室温孵育 40 min,加入 PI,室温作用 2 min,PBS 漂洗后甘油封片,激光共聚焦显微镜(Leica)观察并采图。

1.2.6 Western blot 检测 Rg1 对 K562 细胞 STAT5 蛋白表达的影响 按 1.2.2 方法分组和培养细胞,收集 24、48、72 h 细胞,用全细胞裂解液裂解和核浆蛋白提取试剂盒裂解细胞并提取核、浆蛋白,Bradrd 法测定蛋白浓度,用相应的蛋白提取液将

各组蛋白总蛋白浓度调整一致。取每组样品 40 μL 与 10 μL 缓冲液混匀,进行 SDS-PAGE 电泳并转移到 PVDF 膜上,电转 2 h, 5% 脱脂奶粉 37 ℃封闭 PVDF 膜 1 h,加入抗 STAT5、Phosphor-STAT5,抗体稀释度为 1∶500。显示条带扫描室温孵育 1 h, 4 ℃过夜,次日 TTBS 漂洗后加入辣根过氧化物酶标记山羊抗兔 IgG 二抗,37 ℃作用 1 h。TTBS 洗 3 次,DAB 显色、晾干、拍照,采用 Quantity One 图像分析软件进行图像分析,数据进行统计学处理。

1.3 统计学分析

采用 SPSS 14.0 软件对数据进行统计处理,多组间比较采用单因素方差分析,两两比较采用 Dunnett-*t* 检验。

2 结果

2.1 人参皂苷 Rg1 对 K562 细胞周期的影响

流式细胞仪检测结果(图 1)显示:与空白对照组(12.15%)比较,人参皂苷单体 Rg1 作用后 K562 细胞 S 期比例增加(Rg1 作用 24、48、72 h S 期比例分别为 26.38%、52.99%、39.99%),其中 48 h 增加最大,差异具有统计学意义($P<0.05$)。提示 Rg1 有抑制 K562 细胞增殖的作用。

2.2 人参皂苷单体 Rg1 对 K562 细胞血红蛋白合成的影响

人参皂苷 Rg1 作用 K562 细胞不同时间后,细胞合成血红蛋白(Hb)的量与对照组相比具有显著性提高($P<0.05$),且 48 h Hb 含量达高峰。提示 Rg1 有诱导 K562 细胞血红蛋白合成的作用。见表 1。

表 1 Rg1 作用不同时间 K562 细胞血红蛋白(Hb)含量

(μg/L, $n=3$, $\bar{x}\pm s$)

组别	24 h	48 h	72 h
空白对照组	0.410±0.031	0.510±0.012	0.405±0.029
Rg1 组	0.710±0.022[a]	0.810±0.026[a]	0.736±0.071[a]

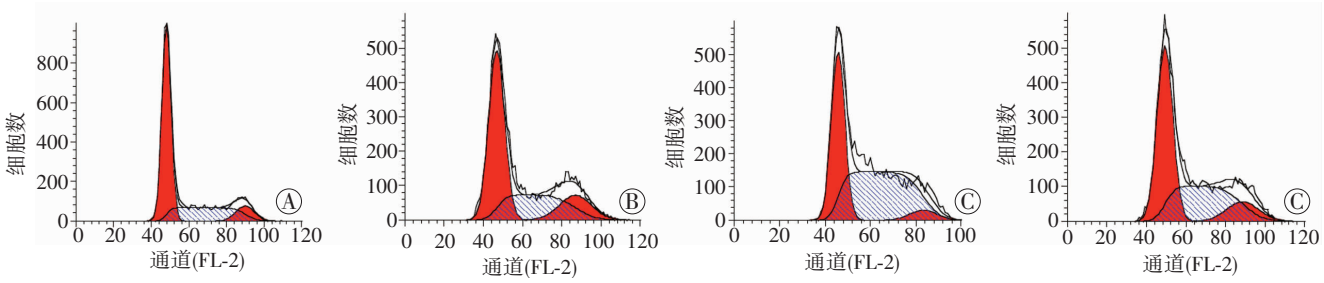
a: $P<0.05$,与空白对照组比较

2.3 人参皂苷单体 Rg1 诱导 K562 细胞向成熟细胞分化的形态学变化

Wright's 染色显示空白对照组 K562 细胞体积大,细胞核大而明显,细胞核和细胞质的比例大,细胞质成强嗜碱性,无特殊颗粒,见图 2A;经人参皂苷单体 Rg1 诱导 24 h 后, K562 细胞体积缩小,细胞核直径减小,核染色质浓缩, 细胞质丰富, 细胞核和细胞质的比例降低,见图 2B;诱导 48、72 h 后,K562 细胞直径和体积有进一步变小的趋势, 细胞向成熟红系方向分化趋势更明显,见图 2C、D。

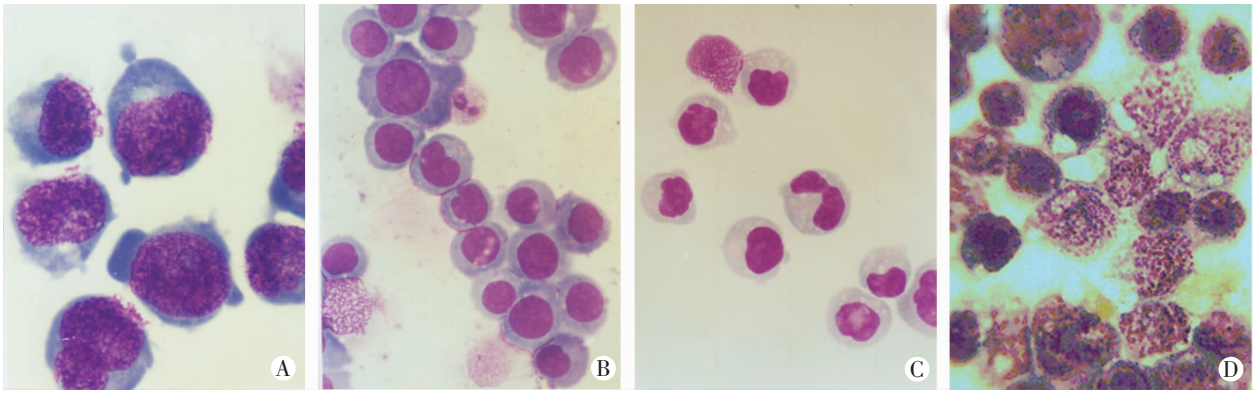
2.4 人参皂苷单体 Rg1 对 K562 细胞 STAT5 蛋白分布的影响

FITC 荧光抗体标记 STAT5 蛋白后为绿色,PI 染料复染细胞核后为红色。激光共聚焦扫描结果显示空白对照组细胞核内 STAT5 绿色荧光标记多,几乎覆盖红色标记的细胞核;经人参皂苷单体 Rg1 诱导 48 h 后,STAT5 蛋白开始转出细胞核至细胞质内,细胞质内绿色荧光标记呈月牙状分布增多,细胞核内绿色荧光标记分布减少。见图 3。



A:空白对照组; B: Rg1 组 24 h; C: Rg1 组 48 h; D: Rg1 组 72 h

图 1 流式细胞仪检测 Rg1 作用不同时间 K562 细胞周期



A:空白对照组; B: Rg1 组 24 h; C: Rg1 组 48 h; D: Rg1 组 72 h

图 2 Wright's 染色检测 Rg1 诱导 K562 细胞向红系细胞分化情况(×400)

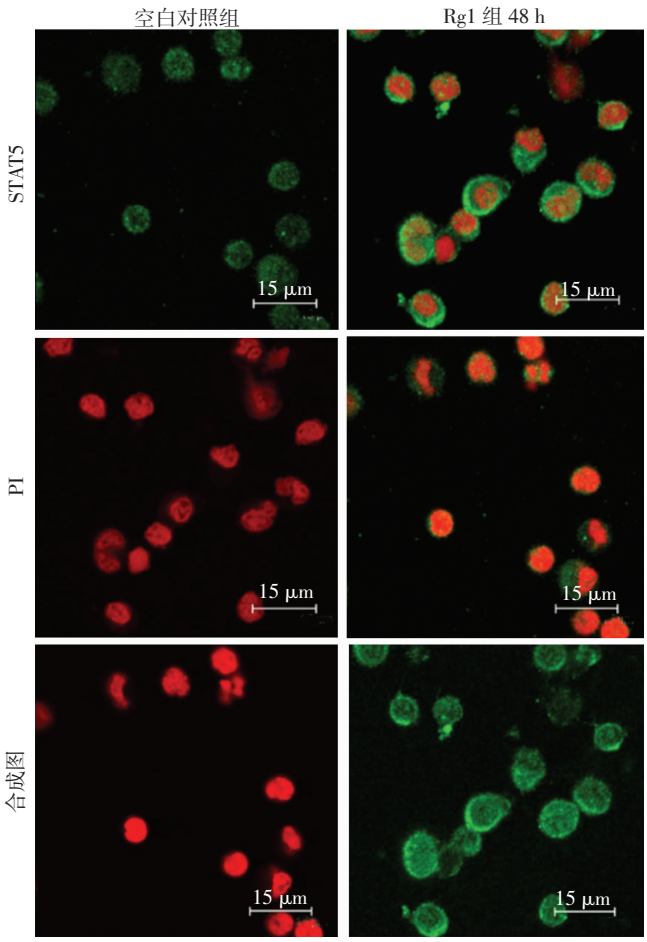
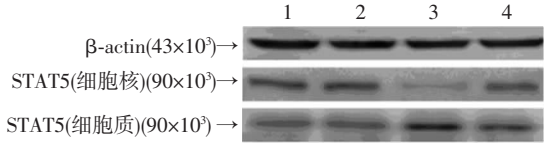


图3 激光共聚焦显微镜观察 Rg1 诱导 K562 细胞 STAT5 蛋白分布

2.5 人参皂苷单体 Rg1 对 K562 细胞 STAT5 蛋白表达的影响

Western blot 检测显示 Rg1 作用 K562 细胞后细胞质内 STAT5 的表达水平随着作用时间而增强，细胞核内 STAT5 的表达水平随着作用时间而减弱，作用 48 h 变化最明显。见图 4、表 2。



1：空白对照组；2：Rg1 组 24 h；3：Rg1 组 48 h；4：Rg1 组 72 h

图4 Western blot 检测 Rg1 作用不同时间 K562 细胞 STAT5 的表达

表2 Western blot 检测 Rg1 作用不同时间 K562 细胞 STAT5 的表达（$n=3$，$\bar{x}\pm s$）

组别	STAT5(细胞核)	STAT5(细胞质)
空白对照组	0.701 ± 0.010	0.694 ± 0.011
Rg1 组 24 h	0.712 ± 0.026	0.710 ± 0.022
Rg1 组 48 h	0.259 ± 0.033[a]	1.235 ± 0.003[a]
Rg1 组 72 h	0.403 ± 0.031[a]	0.989 ± 0.013[a]

a：$P<0.05$，与空白对照组比较

3 讨论

白血病细胞的生物学特点是细胞增殖失控，分化成熟受阻，正常凋亡程序失调，导致异常分化细胞大量增殖。因此，治疗白血病的有效方法就是抑制细胞增殖，诱导异常分化的细胞向成熟方向分化[4-6]。K562 细胞来源于慢性粒细胞性白血病 CML，融合基因 bcr/abl 表达强阳性，具有多向分化潜能，在药物等诱导下可向红系、粒系和巨核系细胞分化，是研究诱导因素对细胞增殖分化的理想模型。

人参能抑制肿瘤细胞增殖并诱导其向成熟方向分化，本课题组也研究发现人参的主要有效成分 ——人参总皂苷 TSPG 有明显抑制白血病细胞 K562 增殖和诱导分化的作用[7]。但人参总皂苷含多种单体，不同单体药理效应和作用机制不尽相同。人参皂苷单体 Rg1 作为人参总皂苷中的主要单体成分之一，在人参皂苷中含量为 22.16%，其对白血病细胞的作用研究少有报道。而我们既往初步研究结果[3]显示 Rg1 在浓度为 20 μmol/L 时能明显抑制 K562 的增殖，但其作用机制却尚不清楚。因此，本研究将从人参皂苷单体 Rg1 对白血病细胞株 K562 的增殖抑制和诱导分化作用及其分子机制进行研究，期望为临床治疗白血病提供理论依据和一个新的研究方向。

本研究发现 Rg1 组与空白对照组相比，G_1 期细胞数减少，S 期细胞数增加，提示 Rg1 可使细胞阻滞于 S 期，延缓由 S 期进入 G_2/M 期，从而使细胞增殖能力受到限制。那么其是否通过促进 K562 细胞向成熟的红系分化呢？这需要我们下一步进行研究。

正常红细胞分化成熟的形态规律是：细胞体积逐渐减小，细胞核内染色质逐渐致密，细胞质增多，细胞质和细胞核的比例减小，细胞质嗜碱性逐渐减弱，血红蛋白逐渐出现并增多[8-10]。本研究结果表明：经人参皂苷单体 Rg1 20 μmol/L 作用 K562 细胞后，细胞发生了上述形态的分化现象：即 K562 细胞体积变小，细胞质和细胞核的比例缩小，细胞核与细胞质发育不平衡；同时血红蛋白测定结果也表明：Rg1 诱导 K562 细胞合成血红蛋白的量增加，且在 48 h 血红蛋白合成量与对照组差异明显。以上提示 Rg1 可能诱导 K562 细胞向红系细胞分化。

STATs 蛋白具有信号转导及转录激活的双重活性，作为一种重要的转录调控因子，其一直是生物学研究的热点。作为 STATs 家族的一员，STAT5 的表达和

活性与白血病K562细胞的发生和发展密切相关。K562细胞系来源于慢性髓系白血病急变的患者,在K562细胞系中,bcr/abl基因序列区域含有STAT5、Ras、Myc、Cyclin D和P13等致白血病活化信号,bcr/abl基因能够激活STAT5信号分子,STAT5的表达异常和STAT5的激活可使bcr/abl转化细胞获得增殖和生存能力,活化的STAT5既可增强Cyclin D1、c-ms和c-jun等的表达,促进肿瘤增殖,还可激活抗凋亡途径中Bcl-xL、McL-1、Cyclin D1/2的表达,抑制肿瘤凋亡[11-13]。本研究通过Western blot法检测了Rg1作用K562细胞后STAT5表达与活性的变化,结果发现细胞质内STAT5的表达水平随着作用时间增加而增强,细胞核内STAT5的表达水平随着作用时间增加而减弱;实验还通过激光共聚焦扫描显微镜观察了Rg1作用K562细胞后STAT5在细胞的分布情况,结果也显示细胞质内STAT5的荧光强度明显增强,细胞核内STAT5荧光强度明显减弱。研究表明,正常细胞在非刺激的情况下,细胞中STAT5蛋白绝大多数位于细胞质中,然而在接受刺激的情况下,细胞质中STAT5蛋白会迅速转运到细胞核内,诱导相应靶基因表达,进而诱导细胞增殖;在刺激信号终止后,STAT5蛋白又迅速由胞核转运回到细胞质中。而在K562慢性白血病细胞株中,STAT分子被bcr/abl持续的激活刺激并转至细胞核内,核内活化的STAT5通过增强Cyclin D1、c-fos和c-jun等的表达,促进K562细胞不断增殖。在研究中,我们用Rg1去作用具有上述特点的K562细胞,结果发现Rg1改变了K562细胞内原有的STAT5的分布和细胞质、细胞核内的表达,从而抑制了K562细胞增殖并诱导其向成熟方向转化。此种结果可能的原因为:①Rg1影响了K562细胞STAT5从细胞质到细胞核的正常运转(即转位阻滞);②Rg1促进了K562细胞STAT5从细胞核里面转回细胞质(即逆转位)。以上两种原因使细胞质中STAT5蛋白的表达水平增加、细胞核中STAT5蛋白的表达水平降低,抑制了STAT5转录因子对靶基因的转录激活作用,这可能是Rg1抑制K562细胞增殖并诱导其向成熟方向转化的分子机制。

参考文献:

[1] Wang C Z, Luo X, Zhang B, *et al*. Notoginseng enhances anti-cancer effect of 5-fluorouracil on human colorectal cancer cells[J]. Cancer Chemother Pharmacol, 2007, 60(1): 69-79.

[2] 陈薇, 胡广林, 王翊如, 等. 高效液相色谱法分离测定人参中的6种人参皂甙[J]. 色谱, 2000, 18(5): 439-441.

[3] 王红宁, 左国伟, 李春莉, 等. 人参皂苷单体Rb1及Rg1对白血病细胞K562增殖的影响[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2009, 13(40): 7829-7832.

[4] Socolovsky M, Nam H, Fleming M D, *et al*. Ineffective erythropoiesis in STAT5a(-/-)5b(-/-) mice due to decreased survival of early erythroblasts[J]. Blood, 2001, 98(12): 3261-3273.

[5] Kirito K, Nakajima K, Watanabe T, *et al*. Identification of the human erythropoietin receptor region required for STAT1 and STAT3 activation [J]. Blood, 2002, 99(1): 102-110.

[6] Rane S G, Reddy E P. JAKs, STATs and Src kinases in hematopoiesis [J]. Oncogene, 2002, 21(21): 3334-3358.

[7] Zuo G, Guan T, Chen D, *et al*. Total saponins of Panax ginseng induces K562 cell differentiation by promoting internalization of the erythropoietin receptor[J]. Am J Chin Med, 2009, 37(4): 747-757.

[8] Schipper L F, Brand A, Reniers N, *et al*. Differential maturation of megakaryocyte progenitor cells from cord blood and mobilized peripheral blood[J]. Exp Hematol, 2003, 31(4): 324-330.

[9] Smetana K, Karban J, Trneny M. To the nucleolar bodies (nucleoli) in cells of the lymphocytic lineage in patients suffering from B-chronic lymphocytic leukemia[J]. Neoplasma, 2010, 57(6): 495-500.

[10] Perez-Andres M, Paiva B, Nieto W G, *et al*. Human peripheral blood B-cell compartments: a crossroad in B-cell traffic[J]. Cytometry B Clin Cytom, 2010, 78(Suppl 1): S47-S60.

[11] Jagoueix S, Bove J M, Garnier M. Comparison of the 16S/23S ribosomal intergenic regions of "Candidatus Liberobacter asiaticum" and "Candidatus Liberobacter africanum," the two species associated with citrus huanglongbing (greening) disease[J]. Int J Syst Bacteriol, 1997, 47(1): 224-227.

[12] Lin H, Doddapaneni H, Bai X, *et al*. Acquisition of uncharacterized sequences from Candidatus liberibacter, an unculturable bacterium, using an improved genomic walking method[J]. Mol Cell Probes, 2008, 22(1): 30-37.

[13] Doddapaneni H, Liao H, Lin H, *et al*. Comparative phylogenomics and multi-gene cluster analyses of the Citrus Huanglongbing (HLB)-associated bacterium Candidatus Liberibacter[J]. BMC Res Notes, 2008, 1: 72.

(**收稿**:2013-07-04;**修回**:2013-09-15)

(编辑 吴培红)