论著

DOI:10.16016/j.1000-5404.201411202

microRNA 26b-5p 靶向下调 p300 对人脐带间充质干细胞的增殖作用

李娅莎,杨 珂,朱 静,毕 杨,谭 彬,田鹤锋,易 勤,钟海英 (400014 重庆,重庆医科大学附属儿童医院儿科研究所,儿童发育疾病研究教育部重点实验室,儿科学重庆市重点实验室,重庆市干细胞治疗工程技术研究中心)

[摘要] **目的** 探讨潜在 microRNA 靶向下调 p300 表达水平对人脐带间充质干细胞(human umbilical cord derived mesenchymal stem cells, hUC-MSCs)增殖的影响。**方法** 通过双荧光素酶报告基因(Firefly/Renilla Luciferase)系统筛选出作用于 p300 3′ UTR 的目标 microRNA,mimic 转染 UC-MSCs 后 RT-qPCR 检测 miRNA 表达水平的变化,Western blot 检测 p300 蛋白水平变化,RT-qPCR 和 Western blot 检测多潜能转录因子表达水平的变化,MTT 法检测 UC-MSCs 增殖能力的变化,并比较克隆形成能力的差异。**结果** 证实 mir 26b-5p 通过不完全互补配对结合 p300 的 3′ UTR 区,显著降低了荧光素酶的相对活性($P<0.05$);mir 26b-5p mimic 转染后抑制 p300 蛋白表达水平($P<0.05$),并下调 Nanog 基因和蛋白表达水平($P<0.05$);mir 26b-5p mimic 转染后 UC-MSCs 的增殖受到抑制($P<0.05$),克隆形成能力下降($P<0.05$)。**结论** UC-MSCs 高表达 mir 26b-5p 能够显著抑制 p300 蛋白表达和干性相关基因 Nanog 的表达,并且抑制 UC-MSCs 的增殖能力和克隆形成能力。

[关键词] 人脐带间充质干细胞;转录共激活因子 p300;mir 26b-5p;Nanog
[中图法分类号] R329.2;R394-33;R394.2 [文献标志码] A

MicroRNA 26b-5p inhibits cell proliferation by targeting p300 in human umbilical cord mesenchymal stem cells

Li Yasha, Yang Ke, Zhu Jing, Bi Yang, Tan Bin, Tian Hefeng, Yi Qin, Zhong Haiying (Institute of Pediatrics, Key Laboratory of Child Development and Disorders of Ministry of Education, Chongqing Key Laboratory of Pediatrics, Chongqing Research Center of Engineering for Stem Cell Therapy, the Children's Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing, 400014, China)

[**Abstract**] **Objective** To investigate the target microRNA and its effect on the down-regulation of transcriptional coactivator p300, and then on the proliferation of human umbilical cord derived mesenchymal stem cells (hUC-MSCs). **Methods** Dual luciferase gene reporter system (Firefly/Renilla Luciferase) was used to screen the effective microRNA targets which interacted with p300 3′ UTR. Then the hUC-MSCs were transfected with microRNA mimics, and the expression of p300 3′ UTR at miRNA and protein levels was detected by RT-qPCR and Western blotting respectively. The levels of pluripotency transcription factors including Nanog, Oct4 and Sox2 were measured by RT-qPCR and Western blotting too. MTT assay was employed to detect the proliferation and colony formation in hUC-MSCs before and after the transfection of microRNA mimics. **Results** It was found that mir 26b-5p binding to p300 3′ UTR with imperfectly matched sequence. The Firefly/Renilla's relative activity of mir 26b-5p/pmirGLO-p300 3′ UTR co-transfected group was decreased significantly ($P<0.05$). The protein expression level of p300 was significantly reduced after mir 26b-5p transfection compared with NC-mimic transfection ($P<0.05$), and the mRNA and protein expression levels of Nanog were significantly down-regulated after the transfection ($P<0.05$). The mir

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81371718);重庆市教委科学技术研究项目(KJ110301)
[通信作者] 杨 珂,E-mail:78210114@163.com
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20150319.0952.010.html (2015-03-19)

26b-5p transfection also reduced the proliferation and colony formation of UC-MSCs ($P<0.05$). **Conclusion** mir 26b-5p suppresses the protein expression levels of p300 and Nanog, a pluripotency transcription factor in UC-MSCs, and also inhibits the cell proliferation and colony formation capability.

[**Key words**] human umbilical cord derived mesenchymal stem cells; transcriptional co-activator p300; microRNA 26b-5p; Nanog

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (81371718) and the Project of Science and Technology Research of Chongqing Municipal Education Committee (KJ110301). Corresponding author: Yang Ke, E-mail: 78210114@163.com

人脐带间充质干细胞(human umbilical cord derived mesenchymal stem cells, hUC-MSCs)因其取材方便、无免疫排斥反应、具有多向分化潜能等优势而成为再生医学研究领域的热点种子细胞[1]。如何有效地维持干细胞的"干性"和增殖活性,成为干细胞应用于临床的一个关键因素。p300既是转录辅助因子,也是一种重要的组蛋白乙酰基转移酶,可调节靶基因表达,对细胞的增殖、分化以及器官的发育形成有重要的作用。目前发现参与调节胚胎干细胞相关转录因子的表达,并参与胚胎干细胞多向分化能力的调节。microRNA(miRNA)是一种由20~23个核苷酸片段构成的短片段RNA,通过其负向调节的靶基因在干细胞的自我更新、定向分化和组织再生中,起着十分重要的作用[2]。本研究筛选并验证调节p300表达水平的microRNA,探讨其对hUC-MSCs增殖的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

hUC-MSCs来源于重庆市干细胞治疗工程技术研究中心,HEK-293T细胞株由本实验室保存,pmirGLO luciferase miRNA vector质粒由以色列Hadassah-Hebrew University Hospital Dr Eithan Galun惠赠,Dual-Glo Luciferase Assay System、PureYield™ Plasmid Miniprep System购自Promega公司,脂质体Lipofectamine TM 2000购自Invitrogen公司,限制性内切酶*Nhe* Ⅰ、*Xba* Ⅰ和*Dra* Ⅰ、*Taq* DNA聚合酶、DNA Ligation Kit、引物购自TaKaRa公司,胎牛血清、DMEM/High Glucose、D/F12培养基购自Gibco公司,p300单克隆抗体购自Abcam公司,Nanog蛋白单克隆抗体购自Biolegend公司,miRNA模拟物(mimics)购自上海吉玛制药技术有限公司。

1.2 方法

1.2.1 p300 3′ UTR-双荧光素酶报告基因载体的构建和鉴定 根据Targetscan 6.2软件(http://www.targetscan.org/)获取人p300基因的3′ UTR区域的序列,上下游分别插入限制性内切酶*Nhe* Ⅰ、*Xba* Ⅰ的识别位点,序列:5′-GGTGCTAGCCCTCTCACAGAGTACACTAG-3′, 5′-CGCTCTAGAGTCTGTCTCACACAGTTTAT-3′;以人外周血基因组DNA为模板通过PCR扩增得到P300基因的3′ UTR片段,插入质粒pmirGLO luciferase miRNA vector并转化,挑取单克隆进行菌落PCR鉴定。

1.2.2 mir mimic/pmirGLO-p300 3′ UTR共转染检测双荧光素酶 取对数生长期的HEK-293T细胞按60%密度接种于96孔板中,以mir mimic/plasmid[(100 nmol/L)/100 ng]最适比例共转染细胞,根据生物信息学分析获得目标:mir 212-3p、mir 22-3p、mir 200b-3p、mir 200c-3p、mir 429、mir 182-5p、mir 26b-5p;设定mir mimics阴性对照组,序列为5′-UUCUCCGAACGUGUCACGU-TT-3′,与pmirGLO-p300 3′ UTR共转染后,分别测量萤火虫荧光素酶活性(Firefly)和作为内参的海肾荧光素酶活性(Renilla),以Firefly/Renilla的值作为荧光素酶相对活性,转染pmirGLO处理组作为空白对照,将各组荧光素酶活性值进行归一化,以相对活性比值进行组间比较。

1.2.3 mir mimic转染UC-MSCs细胞 取对数生长期的hUC-MSCs按60%密度接种于6孔板中,将mimic-FAM(100 nmol/L)分别转染细胞,6~8 h镜下观察FAM荧光基团的分布,24 h收集细胞做流式细胞术检测转染率,以明确mimic转染效率;设立mir 26b-5p实验组和阴性对照组,转染后48 h收集细胞,RT-qPCR检测mir 26b-5p mimic转染后miRNA表达水平,按照天根公司miRcute miRNA提取试剂盒操作说明提取miRNA;按Gene Copoeia公司All-in-One miRNA QRT-PCR Detection Kit操作说明进行miRNA的RT-qPCR,选择人U6基因为内参,目标miRNA相对表达倍数用$2^{-\triangle\triangle Ct}$公式计算。

1.2.4 Western blot检测mir 26b-5p mimic转染后目的蛋白水平变化 取对数生长期的hUC-MSCs按60%密度接种于6孔板中,设立mir 26b-5p实验组和阴性对照组,空白组细胞不做处理,细胞转染48 h后收集提取总蛋白,BCA法检测蛋白浓度,取50 mg蛋白/孔上样电泳,采用冰浴湿转250 mA转膜2.5 h,然后封闭孵育1 h,分别加入一抗4 ℃孵育过夜,PBST缓冲液洗膜,再入荧光二抗(1∶20 000)室温孵育1 h,Odyssey近红外双色激光成像系统采集图像并进行分析。

1.2.5 RT-qPCR检测mir 26b-5p mimic转染后mRNA表达 分组处理如1.2.4，细胞转染48 h后Trizol一步法提取细胞的总RNA，并逆转录为cDNA，进行RT-qPCR检测，上下游引物序列见表1，选择人GAPDH基因为内参，目的基因的相对表达倍数用$2^{-\triangle\triangle Ct}$公式计算。

表1 qPCR引物序列表

基因名称		引物序列	片段大小(bp)
human Oct4	上游引物	5′-GTGGAGGAAGCTGACAACAA-3′	120
	下游引物	5′-ATTCTCCAGGTTGCCTCTCA-3′	
human Sox2	上游引物	5′-TACCTCTTCCTCCCACTCC-3′	185
	下游引物	5′-TGTGTGAGAGGGGCAGTGT-3′	
human Nanog	上游引物	5′-CAGTCCCAAAGGCAAACAA-3′	163
	下游引物	5′-CTGCTGGAGGCTGAGGTAT-3′	
human GAPDH	上游引物	5′-CAACGAATTTGGCTACAGCA-3′	170
	下游引物	5′-AGGGGAGATTCAGTGTGGTG-3′	

1.2.6 MTT法检测mir 26b-5p mimic转染后细胞增殖 取对数生长期的UC-MSCs按5×10^3/孔接种于96孔中，每组为6个复孔，待细胞贴壁后，设立转染mir 26b-5p mimic实验组和阴性对照组，空白组细胞不做处理，于1、2、3、4、5 d分别加入20 μL MTT(5 mg/mL)，37 ℃孵育4 h后吸弃上清，加入150 μL DMSO并充分振摇，使结晶溶解后用多功能酶联免疫检测仪于492 nm波长处测量每孔的光密度值[D(492)]，并绘制生长曲线。

1.2.7 CFU-F检测mir 26b-5p mimic转染后细胞克隆形成能力 分组处理如1.2.4，转染24 h后，将细胞消化，制成细胞悬液并计数，6孔板每孔铺500个细胞，每组设3复孔，10 d后结晶紫染色并扫描，计算克隆形成数。

1.3 统计学处理

采用GraphPad Prism 4.0统计软件，2组间比较采用t检验，多组数据比较采用单因素方差分析。

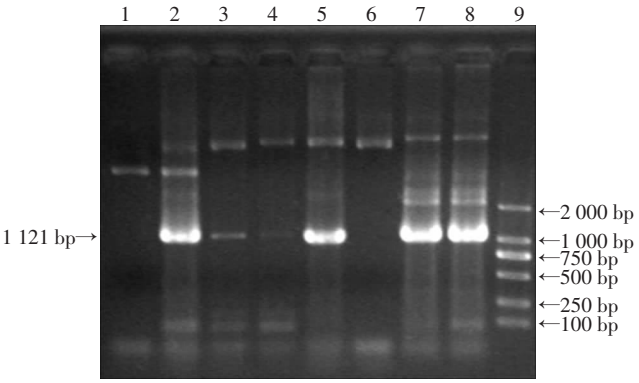
2 结果

2.1 p300 3′ UTR-双荧光素酶报告基因载体的鉴定

成功扩增到p300 3′ UTR区1 121 bp大小的PCR片段，符合预期大小，构建重组质粒pmirGLO-p300 3′ UTR，随机挑取单克隆做菌落PCR，电泳出现约1.1 kb的阳性扩增带(图1)，测序验证与p300 3′ UTR序列相符合。

2.2 双荧光素酶相对活性检测mir mimic和P300 3′ UTR的结合作用

根据生物信息学分析获得7个目标片段：mir 212-3p、mir 22-3p、mir 200b-3p、mir 200c-3p、mir 429、mir 182-5p、mir 26b-5p(表2)。各组mir mimic/pmirGLO-p300 3′ UTR共转染293T细胞后，与阴性对照组比较Firefly/Renilla相对活性比值，筛选得到目标miRNA：mir 26b-5p，较阴性对照组的Firefly/Renilla相对活性降低了40.0%($P<0.05$，图2)。



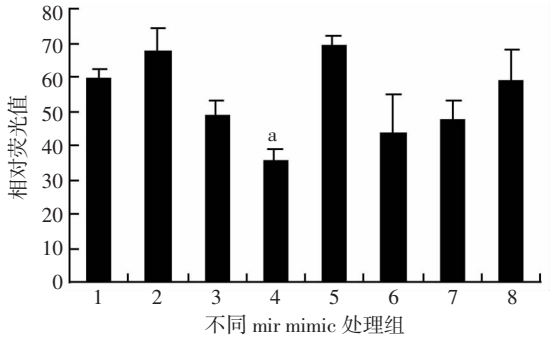
1～8：随机挑取菌落的p300 3′ UTR区PCR扩增；9：DL2000 Marker

图1 pmirGLO p300 3′ UTR的菌落PCR鉴定

表2 miRNAs与p300 3′ UTR区的可能结合序列

配对序列名称	预测靶标序列(上)与miRNA(下)互补配对结果
位点727～733	5′-UCAAAAAUAUACAGGGGCAGCUG-3′
hsa mir 22-3p	3′-UGUCAAGAAGUUGACCGUCGAA
位点669～675	5′-GAGCGUAAAACUUCAAGUAUUAA-3′
hsa mir 200b-3p	3′-AGUAGUAAUGGUCCGUCAUAAU
位点733～739	5′-AUAUACAGGGGCAGCUGCCAAAU-3′
hsa mir 182-5p	3′-UCACACUCAAGAUGGUAACGGUUU
位点978～984	5′-CACACUUUCUAUAAAACUUGAAA-3′
hsa mir 26b-5p	3′-UGGAUAGGACUUAAUGAACUU
位点669～675	5′-GAGCGUAAAACUUCAAGUAUUAA-3′
hsa mir 429	3′-UGCCAAAAUGGUCUGUCAUAAU
位点1 065～1 072	5′-UUGGAUCACUGUAUAGACUGUUA-3′
hsa mir 212-3p	3′-CCGGCACUGACCU-CUGACAAU
位点669～675	5′-GAGCGUAAAACUUCAAGUAUUAA-3′
hsa mir 200c-3p	3′-AGGUAGUAAUGGGCCGUCAUAAU

下划线：两两匹配的序列



1：mir 22-3p；2：mir 200b-3p；3：mir 182-5p；4：mir 26b-5p；5：miR 429；6：mir 212-3p；7：mir 200c-3p；8：阴性对照组 a：$P<0.05$，与阴性对照组比较

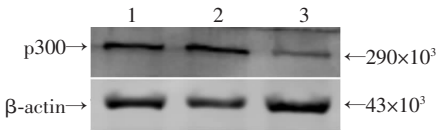
图2 mir mimic/pmirGLO-p300 3′ UTR共转染后Luc/Rel相对活性的比较

2.3　hUC-MSCs 转染 mir mimic

通过荧光倒置显微镜观察，转染 mimic-FAM（100 nmol/L）后的 UC-MSCs 细胞广泛表达星点状 FAM 荧光基团，经流式细胞术检测转染效率高达 99.37%；qRT-PCR 检测结果显示：mir 26b-5p mimic 组中目标 miRNA 表达明显上调，约为阴性对照组的 25.41 倍（$P<0.01$）。

2.4　mimic 转染后 p300 蛋白水平

转染 48 h 后，空白组、阴性对照组和 mir 26b-5p mimic 组中 p300 蛋白表达的相对灰度值依次为 309.27 ± 42.46、334.58 ± 52.64、141.41 ± 24.57；其中 mir 26b-5p mimic 组较阴性对照组 p300 蛋白表达水平下调了 42.26%（$P<0.05$，图 3）。

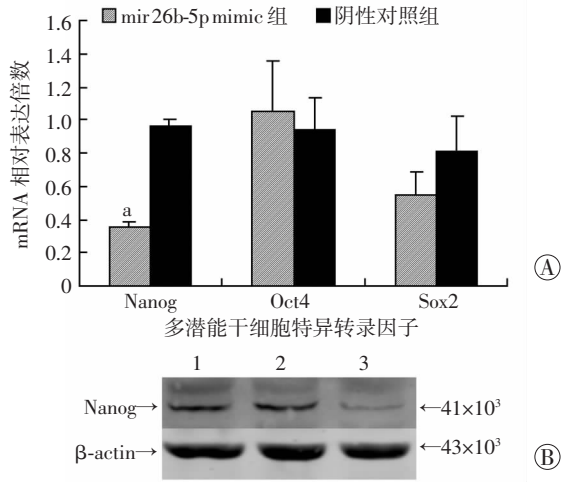


1：空白组；2：阴性对照组；3：mir 26b-5p 组

图 3　mir 26b-5p mimic 转染 UC-MSCs 后 p300 蛋白表达水平

2.5　mimic 转染后多潜能转录因子表达

转染 48 h 后，mir 26b-5p mimic 组较阴性对照组的 Nanog 基因表达水平降低了 2.71 倍（$P<0.05$），而 Oct4、Sox2 基因 mRNA 表达水平没有明显变化；同时 mir 26b-5p mimic 组较空白组、阴性对照组细胞中 Nanog 蛋白表达水平显著下降（$P<0.05$），空白组和阴性对照组相比无显著性差异（图 4）。

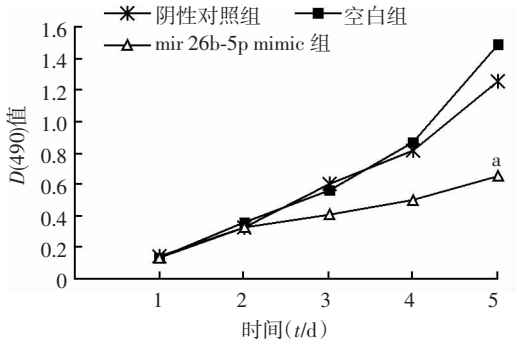


A：RT-qPCR 分析　a：$P<0.05$，与阴性对照组比较；B：Western blot 检测　1：空白组；2：阴性对照组；3：mir 26b-5p 组

图 4　mir 26b-5p mimic 转染 UC-MSCs Nanog mRNA 和蛋白表达水平

2.6　MTT 法检测转染后 UC-MSCs 的生长曲线

与阴性对照组相比，mir 26b-5p mimic 组细胞增殖能力明显下降（$P<0.05$），而空白组和阴性对照组相比差异无统计学意义（$P>0.05$，图 5）。

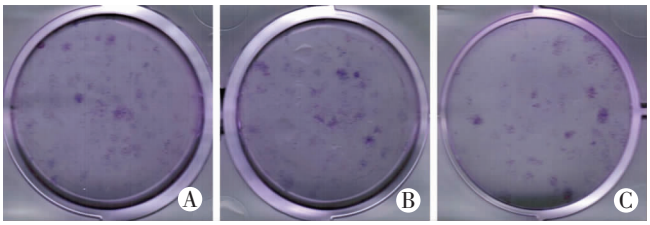


a：$P<0.05$，与空白组及阴性对照组比较

图 5　mir 26b-5p mimic 转染 UC-MSCs 后生长曲线

2.7　CFU-F 检测转染后 UC-MSCs 的克隆形成能力

mir 26b-5p mimic 组细胞克隆形成能力明显下降，空白组和阴性对照组形成克隆数分别为 29.33 ± 2.08 和 27.67 ± 2.52，而 mir 26b-5p mimic 组为 17.67 ± 2.51（$P<0.05$），空白组和阴性对照组相比无显著性差异（$P>0.05$，图 6）。



A：空白组；B：阴性对照组；C：mir 26b-5p mimic 组

图 6　mir 26b-5p mimic 转染 UC-MSCs 后克隆形成能力

3　讨论

间充质干细胞（mesenchymal stem cells，MSCs）是一类具有自我更新和多向分化潜能的成体干细胞，广泛存在于外周血、骨髓、脂肪、骨实质、脐带血、脐带、胎盘、羊膜等组织[3]，其中 hUC-MSCs 具有易于分离培养、获取方式无伤害性、无伦理学争议、可进行自/异体移植、免疫原性低等优点，是一类理想的间充质干细胞，在临床细胞治疗方面有广阔的应用前景[4]。

转录共激活因子 p300 是组蛋白乙酰基转移酶（histone acetyltransferase，HATs）家族中的一员，通过表观遗传调控，“启动”或“关闭”靶基因的表达，在细胞的增殖、分化以及器官的发育形成中发挥重要作用。Zhong 等[5]发现 p300 基因敲除的胚胎干细胞（embryonic stem cells，ESCs）在体外诱导拟胚体形成过程中，3 个胚层的分化发生了异常，提示 p300 在维持 ESCs 的全能性方面有重要作用。Fang 等[6]也报道 p300/CBP 通过乙酰化作用改变染色质结构，在维持胚胎干

细胞的自我更新和多能性中发挥作用。而 p300 在成体干细胞中的研究鲜有报道。本研究探讨了 p300 在 hUC-MSCs 中可能的调节和作用方式。

miRNA 属于内源性的非编码 RNA 家族,长度为 19～25 nt,可以与基因 mRNA 的 3′ UTR 区结合,起到在转录后水平调控基因表达的作用。已有研究表明 miRNA 在组织发育、干细胞增殖分化过程中有重要作用[2,7]。选择 p300 作为潜在 miRNA 的下游调控目标,通过生物信息学分析和双荧光素酶报告基因系统筛选得到 mir 26b-5p 通过种子序列互补配对方式结合 p300 3′ UTR 区,明显抑制 Luc/Rel 相对活性,相应 miRNA mimic 转染 UC-MSCs 后显著下调 p300 蛋白表达。进一步实验发现 mir 26b-5p 高表达后明显抑制了 UC-MSCs 的增殖能力和克隆形成能力,提示转录共激活因子 p300 的高活性对维持 UC-MSCs 的自我更新能力有重要作用。

Nanog、Oct-4、Sox-2 通过调节 ESCs 的基因转录,对其多潜能性和自我更新能力具有关键性的调控作用。目前发现人体多种组织来源的间充质干细胞同样表达 ESCs 的这些分子标志,并具有与 ESCs 中相类似的功能和干性维持作用[8]。MSCs 随着传代扩增,其增殖分化潜能和 Nanog、Oct4 基因表达显著下降,并具有正相关性,而在早期代数的 MSCs 和低氧培养条件则能维持 Nanog、Oct4 基因表达的高表达和多向分化潜能[9-10]。Greco 等[11]发现 Oct4 在 MSCs 具有和 ESCs 中相类似的干性维持作用。本研究发现,hUC-MSCs 同样表达 Nanog、Oct-4、Sox-2 这 3 个转录因子,并且 mir 26b-5p 高表达后 Nanog 的表达明显降低。提示 mir 26b-5p 导致的 UC-MSCs 增殖能力和克隆形成能力的下降,与 Nanog 表达下调有关。

在胚胎干细胞中,p300 可被 Oct-4、Nanog 和 Sox-2 招募到染色体上相应结合位点,调节其转录活性[12]。p300 可以结合在 Nanog 基因的转录调控区并可能通过组蛋白乙酰化修饰调控其表达。郭允倩等[13]报道 p300 通过 homebox 结构域增强 Nanog 转录活性,明确 p300 通过稳定 Nanog 的表达来维持 ESCs 的亚全能性。在胚胎干细胞体外诱导分化时,p300 基因的缺失使 ES 细胞向内中外 3 个胚层的分化发生的异常,可以部分地被 Nanog 基因的外源过量表达修复[5]。本实验验证了 mir 26b-5p 靶向抑制 p300 表达,因此 mir 26b-5p 导致的细胞增殖能力的下降和 Nanog 表达的降低,均可能受 p300 表达下调的影响。

综上所述,本研究证实在 UC-MSCs 中 mir 26b-5p 可直接靶向抑制 p300 的表达,已有文献证实 p300 可参与调控 Nanog 基因的表达水平,提示 mir 26b-5p 可通过下调 p300 间接调控 Nanog 表达,进而参与调控干细胞的增殖和干性维持,为研究 UC-MSCs 自我更新能力的维持,增殖分化的调节提供了新的线索。

参考文献:

[1] Wang H S, Hung S C, Peng S T, *et al*. Mesenchymal stem cells in the Wharton's jelly of the human umbilical cord[J]. Stem Cells, 2004, 22(7): 1330-1337.

[2] Melton C, Judson R L, Blelloch R. Opposing microRNA families regulate self-renewal in mouse embryonic stem cells[J]. Nature, 2010, 463(7281): 621-626.

[3] Verfaillie C. Adult stem cells: Tissue specific or not?[M]// Lanza R, Atala A. Essentials of Stem Cell Biology. 3rd ed. Oxford: Elsevier Academic Press, 2006: 23-27.

[4] Choumerianou D M, Martimianaki G, Stiakaki E, *et al*. Comparative study of stemness characteristics of mesenchymal cells from bone marrow of children and adults[J]. Cytotherapy, 2010, 12(7): 881-887.

[5] Zhong X, Jin Y. Critical roles of coactivator p300 in mouse embryonic stem cell differentiation and Nanog expression[J]. J Biol Chem, 2009, 284(14): 9168-9175.

[6] Fang F, Xu Y, Chew K K, *et al*. Coactivators p300 and CBP maintain the identity of mouse embryonic stem cells by mediating long-range chromatin structure[J]. Stem Cells, 2014, 32(7): 1805-1816.

[7] Wang Y, Medvid R, Melton C, *et al*. DGCR8 is essential for microRNA biogenesis and silencing of embryonic stem cell self-renewal[J]. Nat Genet, 2007, 39(3): 380-385.

[8] Riekstina U, Cakstina I, Parfejevs V, *et al*. Embryonic stem cell marker expression pattern in human mesenchymal stem cells derived from bone marrow, adipose tissue, heart and dermis[J]. Stem Cell Rev, 2009, 5(4): 378-386.

[9] Tsai C C, Su P F, Huang Y F, *et al*. Oct4 and Nanog directly regulate Dnmt1 to maintain self-renewal and undifferentiated state in mesenchymal stem cells[J]. Mol Cell, 2012, 47(2): 169-182.

[10] Tsai C C, Chen Y J, Yew T L, *et al*. Hypoxia inhibits senescence and maintains mesenchymal stem cell properties through down-regulation of E2A-p21 by HIF-TWIST[J]. Blood, 2011, 117(2): 459-469.

[11] Greco S J, Liu K, Rameshwar P. Functional similarities among genes regulated by OCT4 in human mesenchymal and embryonic stem cells[J]. Stem Cells, 2007, 25(12): 3143-3154.

[12] Chen X, Xu H, Yuan P, *et al*. Integration of external signaling pathways with the core transcriptional network in embryonic stem cells[J]. Cell, 2008, 133(6): 1106-1117.

[13] 郭允倩, 陈默, 马天骅, 等. p300 通过 homeobox 结构域增强 Nanog 的转录激活活性[J]. 中国生物工程杂志, 2009, 29(10): 1-5.

(**收稿**:2014-11-21;**修回**:2015-01-05)

(编辑 张 维)