DOI:10.16016/j.1000-5404.201512201

氯喹通过上调泛素-蛋白酶体相关分子表达抑制 LPS 活化巨噬细胞的实验研究

丁长钰,龙宇鹏,杨永军,郑 江 (400038 重庆,第三军医大学西南医院综合实验研究中心)

[摘要] **目的** 观察氯喹(chloroquine, CQ)对脂多糖/内毒素(lipopolysaccharide/endotoxin, LPS)刺激的巨噬细胞中泛素-蛋白酶体系统(ubiquitin-proteasome system, UPS)相关分子 A20、TRIM33 和 USP28 表达的影响。**方法** 应用 LPS 刺激小鼠 Raw264.7 细胞,荧光定量 PCR 检测酸化抑制剂 CQ 对 LPS 诱导锌指蛋白 A20、泛素连接酶 TRIM33 和泛素特异性蛋白酶 USP28 的 mRNA 表达,Western blot 检测 CQ 对 LPS 诱导 A20 和 TRIM33 的蛋白表达。应用 siRNA 转染技术沉默 A20,荧光定量 PCR 检测 CQ 对 LPS 诱导炎性细胞因子 TNF 的 mRNA 表达。**结果** 与 LPS 对照组比较,经 CQ 预处理的 Raw264.7 细胞中,A20、TRIM33、USP28 的 mRNA 表达均显著上调[(3.197±0.013) *vs* (1.292±0.009), (1.627±0.113) *vs* (0.797±0.083), (1.387±0.144) *vs* (0.742±0.061), $P<0.05$],A20 和 TRIM33 的蛋白表达也同样上调。采用 siRNA 干扰 A20 基因表达,则 CQ 预处理组细胞中 LPS 诱导的 TNF-α mRNA 表达显著上调[(7.650±0.113) *vs* (4.145±0.120), $P<0.01$]。**结论** CQ 可显著上调 LPS 活化的巨噬细胞中泛素化相关分子 A20、TRIM33 和 USP28 的表达,而干扰 A20 基因表达可显著上调 LPS 活化 Raw264.7 细胞中 TNF-α 的 mRNA 表达,提示泛素-蛋白酶体系统及其相关分子参与 CQ 抑制 LPS-TLR4 信号通路的活化。

[关键词] 氯喹;内毒素;巨噬细胞;泛素-蛋白酶体系统
[中图法分类号] R392-33;R392.32;R978.61 [文献标志码] A

Chloroquine inhibits LPS-induced macrophage activation through up-regulation of ubiquitin-proteasome system related molecules

Ding Changyu, Long Yupeng, Yang Yongjun, Zheng Jiang (General Laboratory Research Center, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

[**Abstract**] **Objective** To determine the effect of chloroquine (CQ) on the expression of ubiquitin-proteasome system (UPS)-related molecules A20, TRIM33 and USP28 in LPS-stimulated Raw264.7 cells and the role of A20 in CQ-pretreated activated Raw264.7 cells. **Methods** The mRNA expression levels of zine finger protein A20, E3 ubiquitin ligase TRIM33 and ubiquitin-specific protease USP28 in CQ-pretreated LPS-activated Raw264.7 cells were measured by real-time PCR, and Western blotting was used to detect these protein expressions. siRNA transfection was used to silence A20, and TNF-α mRNA expression in CQ-pretreated LPS-activated Raw264.7 cells was tested by real-time PCR. **Results** The mRNA expression levels of A20, TRIM33 and USP28 in CQ-pretreated activated Raw264.7 cells were significantly increased compared with LPS treatment only (3.197±0.013 *vs* 1.292±0.009, 1.627±0.113 *vs* 0.797±0.083, 1.387±0.144 *vs* 0.742±0.061, $P<0.05$). The protein expression levels of A20 and TRIM33 in CQ-treated cells were significantly increased. TNF-α mRNA expression was up-regulated in CQ-pretreated cells after siRNA interference of A20 (7.650±0.113 *vs* 4.145±0.120, $P<0.01$). **Conclusion** CQ effectively enhances the mRNA and protein expression levels of A20, TRIM33 and USP28 in LPS-activated macrophages, and

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81171781);重庆市研究生科研创新项目(CYS15232)
[通信作者] 郑 江,电话:(023)68765971,E-mail:zhengj99219@163.com
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20160309.0941.013.html(2016-03-09)

mRNA expression of TNF-α is significantly increased in LPS-activated Raw264.7 cells upon interference with A20, which indicates that UPS may play a role in the inhibitory effect of CQ on activating LPS-TLR4 signaling pathway.

[**Key words**] chloroquine; LPS; A20; USP28

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (81171781) and the Innovation Project for Scientific Research of Postgraduate of Chongqing (CYS15232). Corresponding author: Zheng Jiang, Tel: 86-23-68765971, E-mail: zhengj99219@163.com

脂多糖/内毒素(lipopolysacchride/endotoxin, LPS)是革兰阴性菌外膜的主要成分,是介导脓毒症(sepsis)发生、发展的主要病原体相关分子模式(pathogen-associated molecular patterns, PAMPs),LPS与其模式识别受体(toll-like receptor 4, TLR4)结合后,通过MyD88依赖和TRAM-TRIF依赖的两条信号转导通路,介导核转录因子NF-κB和IRF3的活化,引起TNF及IL-6等细胞因子的表达[1-3]。

泛素蛋白酶体系统(ubiquitin-proteasome system, UPS)是真核细胞中主要溶酶体非依赖的蛋白降解途径,参与炎症、信号转导、转录调控、细胞凋亡和DNA损伤修复等生物学活动[4]。UPS由泛素活化酶E1、泛素结合酶E2、泛素连接酶E3、去泛素化酶DUB和26S蛋白酶体组成。蛋白质的泛素化是一种酶催化的可逆反应,在E1、E2和E3的协同作用下使底物蛋白连接泛素分子而发生泛素化修饰,相反,DUB的作用则是使靶蛋白上连接的泛素分子与底物蛋白解离。现已研究证实,在LPS-TLR4信号通路中,TRAF6及IKKγ/NF-κB essential modulator(NEMO)等信号蛋白的泛素化参与NF-κB的活化过程[5-6],因此UPS相关分子可能对这些信号蛋白进行泛素化修饰降解或失活下调炎症介质的释放,参与NF-κB的调控。近年来该系统在LPS-TLR4信号通路中的调控作用日益受到关注,但具体的调控机制仍有待进一步的研究。

氯喹(chloroquine, CQ)是弱碱性药物,最早作为一线抗疟药应用于临床。后续相关研究显示,CQ还具有阻断内体和溶酶体的酸化成熟、抑制自噬以及体内外拮抗炎症反应等诸多药理学效应[7]。特别是大量研究发现,CQ具有广谱的抗炎活性,对多种炎症介质的释放有显著的抑制作用。但目前有关氯喹抗炎作用的具体机制尚不明确,本课题组前期研究发现,CQ对LPS诱导MyD88依赖和TRAM-TRIF依赖的两条信号通路的活化均有抑制作用,并可下调TLR4两条信号转导通路核转录因子NF-κB和AP-1的活性,抑制TNF-α等细胞因子的释放[8-9]。我们还发现,CQ可通过减少microRNA-669n的表达,上调小泛素相关修饰物特异性蛋白酶6(small ubiquitin-related modifier, SUMO)-specific protease 6, SENP6)的表达,从而下调促炎细胞因子TNF-α和IL-6等的释放[10]。该结果提示泛素化和类泛素化过程可能也参与了氯喹对LPS介导的NF-κB活化以及炎症介质表达的调控过程。为此我们采用组学研究方法对参与此过程的相关分子进行筛选研究,发现UPS及其相关分子可能参与了上述的炎症抑制过程。因此,我们推测CQ可能通过调控UPS及其相关分子的表达及活性,进而发挥对LPS-TLR4信号通路的抑制作用。本研究拟通过研究氯喹对LPS诱导巨噬细胞中UPS相关分子的表达情况及其与炎症介质表达的相关性研究,探讨氯喹抑制LPS炎症反应的可能的作用机制。

1 材料与方法

1.1 实验试剂

氯喹(CQ)、大肠埃希菌LPS(O55:B5)均购自美国Sigma公司;小鼠Raw264.7购自美国ATCC公司;RT-PCR引物由上海生物工程技术服务有限公司合成;A20和TRIM33抗体购自美国CST公司;A20 siRNA由广州锐博生物合成;A20、TRIM33、USP28、TNF-α和内参β-actin引物由上海生工合成;酶联分析仪、半干转印仪、凝胶分析仪均为美国Bio-Rad公司产品。

1.2 细胞培养

小鼠巨噬细胞系Raw264.7加入10%胎牛血清的DMEM培养液传代至6孔板,置CO_2培养箱中孵育过夜。根据实验设计将细胞分为4组:空白对照组、LPS刺激组、CQ处理组和LPS+CQ组(20 μg/mL CQ预处理1 h再加100 ng/mL LPS共同处理),各组细胞分别在LPS加样4 h后收集细胞进行下一步处理。

1.3 RT-PCR检测A20、TRIM33和USP28的mRNA表达

取对数生长期Raw264.7细胞,用TRIzol试剂提取总RNA,以总RNA为模板逆转录为cDNA,并以cDNA为模板进行PCR,引物序列如下表所示。PCR反应条件:94 ℃预变性30 s;94 ℃ 5 s,59 ℃ 10 s,72 ℃ 15 s,共40次循环;经熔解曲线分析后,通过Bio-Rad CFX Manager分析软件进行分析处理,采用$2^{-\Delta\Delta Ct}$法分析A20、TRIM33、USP28的mRNA表达[11]。

表1　PCR引物序列与产物长度

引物名称	引物序列	产物长度(bp)
mouse A20	上游序列 5′-TGTGGGGTGTTCAGGATACTG-3′	77
	下游序列 5′-GTTCCGAGTGTCTGTCTCCTTA-3′	
mouse TNF-α	上游序列 5′-CTGAACTTCGGGGTGATCGG-3′	122
	下游序列 5′-GGCTTGTCACTCGAATTTTGAGA-3′	
mouse USP28	上游序列 5′-CTGCGAGAAATCACAGGCATC-3′	171
	下游序列 5′-GCTGGTAGCACTCTCTTCTACTT-3′	
mouse TRIM33	上游序列 5′-AGATAATGCAAGTGCAGTTGGT-3′	224
	下游序列 5′-ACGTCAATCTATCACACGTTTCA-3′	
mouse β-actin	上游序列 5′- TGGAATCCTGTGGCATCCATGAAAC-3′	349
	下游序列 5′- TAAAACGCAGCTCAGTAACAGTCCG-3′	

1.4　Western blot检测A20、TRIM33的蛋白表达

取对数生长期Raw264.7细胞,CQ和LPS共处理后,弃上清,PBS洗3次,加预冷的细胞裂解液84 μL,冰浴30 min,12 000 r/min离心10 min,取上清。蛋白定量后取10～20 μg总蛋白进行SDS-PAGE并转PVDF膜,5% BSA室温封闭90 min,一抗4 ℃过夜,PBST充分漂洗3～5次,每次10 min,二抗37 ℃孵育2 h,PBST充分漂洗3～5次,每次10 min,膜表面覆盖ECL显色液,置凝胶成像仪观察分析结果。

1.5　A20干扰对CQ预处理LPS活化细胞中TNF-α的mRNA表达影响

取对数生长期Raw264.7细胞,CO_2培养箱中过夜,细胞融合60%～80%进行siRNA转染,按照Roche公司siRNA转染试剂说明书进行操作,转染24 h换液,CQ预处理1h,LPS刺激1 h,TRIzol试剂提取细胞总RNA,以总RNA为模板逆转录为cDNA,并以cDNA为模板进行PCR反应,采用$2^{-\triangle\triangle Ct}$法分析TNF-α的mRNA表达及A20的干扰表达情况。

1.6　统计学分析

计量资料以$\bar{x} \pm s$表示,所有数据采用SPSS 13.0统计软件,应用单因素方差分析进行统计处理。

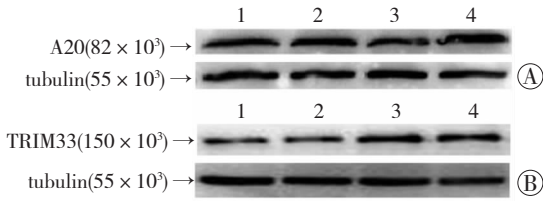
2　结果

2.1　CQ上调LPS诱导Raw264.7细胞中A20、TRIM33和USP28的mRNA表达

RT-PCR结果显示,细胞在基础状态下存在一定的A20、TRIM33和USP28基础表达,当LPS活化Raw264.7细胞,A20的mRNA表达水平较空白对照组有明显增加,TRIM33和USP28的mRNA表达水平低于空白对照组;而CQ处理再给予LPS刺激,A20、TRIM33和USP28的mRNA表达水平较LPS组均有明显上调($P<0.05$,$P<0.01$,图1),说明CQ显著增加LPS诱导的Raw264.7细胞中锌指蛋白A20、E3连接酶TRIM33和泛素特异性蛋白酶USP28的核酸表达水平。

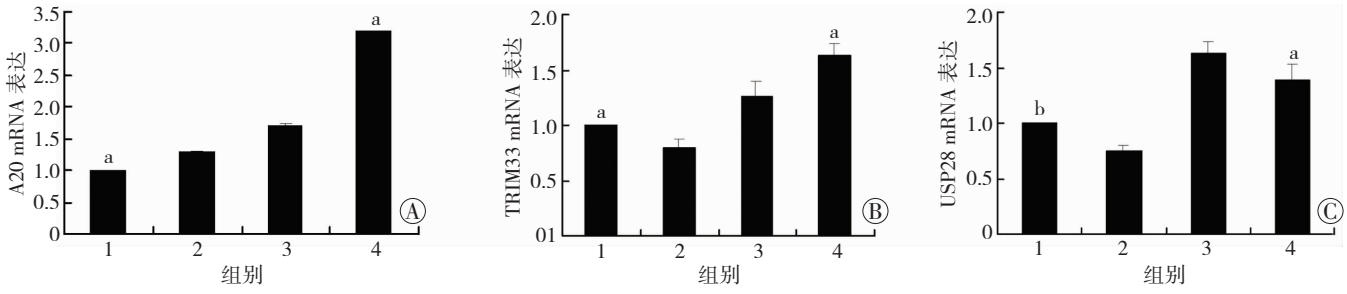
2.2　CQ上调LPS诱导Raw264.7细胞中A20和TRIM33的蛋白表达

Western blot检测结果显示,Raw264.7细胞在未给予任何处理的基础状态下,A20和TRIM33有一定的基础表达量,CQ预处理Raw264.7细胞,再给予LPS刺激,A20和TRIM33的蛋白表达水平较LPS组有明显上调(图2),说明氯喹显著上调LPS刺激的Raw264.7细胞中锌指蛋白A20和E3连接酶TRIM33在蛋白水平的表达。



1:空白对照组;2:内毒素刺激组;3:氯喹处理组;4:内毒素+氯喹处理组

图2　Western blot检测A20(A)和TRIM33(B)的蛋白表达

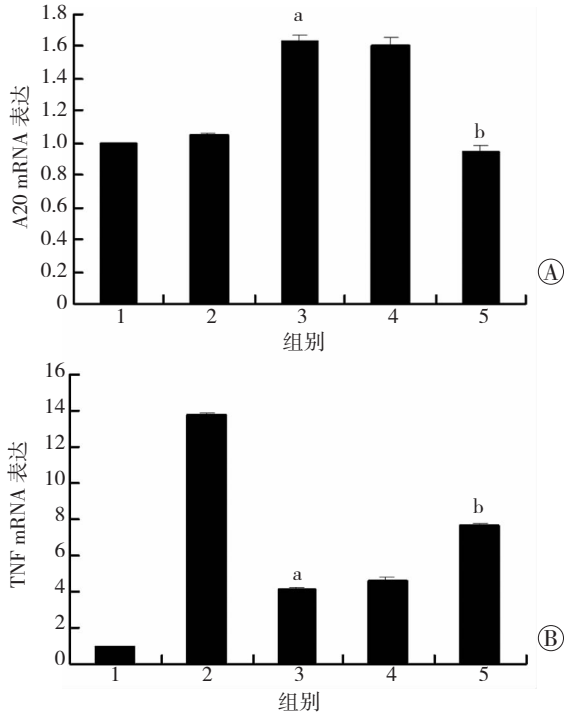


1:空白对照组;2:内毒素刺激组;3:氯喹处理组;4:内毒素+氯喹处理组　a: $P<0.01$, b: $P<0.05$,与内毒素刺激组比较

图1　定量PCR检测CQ处理LPS活化Raw264.7细胞中A20(A)、TRIM33(B)和USP28(C)的mRNA表达

2.3 siRNA 干扰 A20 基因表达显著上调 CQ 处理的 LPS 活化 Raw264.7 细胞中 TNF-α 的 mRNA 表达

RT-PCR 结果显示,Raw264.7 细胞在给予 LPS 刺激后,TNF-α 的 mRNA 表达水平较阴性对照组有明显升高,CQ 预处理 Raw264.7 细胞,再给予 LPS 刺激,其 TNF-α 的 mRNA 表达水平较 LPS 刺激组有显著减少($P<0.01$,图 3B),说明 CQ 预处理可显著抑制 LPS 诱导 Raw264.7 细胞中 TNF-α 的 mRNA 合成。空载 siRNA 转染 Raw264.7 细胞未改变细胞中 A20 的 mRNA 表达量($P>0.05$,图 3A),且空载 siRNA 不影响 CQ 预处理 Raw264.7 细胞中 TNF-α 的 mRNA 表达($P>0.05$,图 3B);siRNA 干扰 A20 基因表达($P<0.01$,图 3B),则增加 CQ 预处理细胞中 TNF-α 的核酸表达水平($P<0.05$,图 3B),提示 A20 参与 CQ 抑制 LPS 活化巨噬细胞中 TNF-α 的 mRNA 表达。



1:空白对照组;2:内毒素刺激组;3:内毒素 + 氯喹处理组;4:内毒素 + 氯喹 + 空载 siRNA 组;5:内毒素 + 氯喹 + A20 siRNA 组 a:$P<0.01$,与内毒素刺激组比较;b:$P<0.05$,与内毒素 + 氯喹 + 空载 siRNA 组比较

图 3 荧光定量 PCR 检测 siRNA 干扰 A20 表达对 CQ 及 LPS 诱导 Raw264.7 细胞中 A20(A)和 TNF(B)的 mRNA 表达

3 讨论

课题组前期研究发现,抗疟药 CQ 对 LPS 诱导 MyD88 依赖和 TRAM-TRIF 依赖的 2 条信号通路均有负反馈抑制作用,抑制 TNF 和 IL-6 等细胞因子的释放[9]。同时我们还发现,CQ 上调 SENP6 的表达,从而下调 TNF-α 和 IL-6 等的释放[10],提示泛素化和类泛素化参与氯喹抑制 NF-κB 的活化过程。因此我们在前期工作基础上进行组学筛选,发现 UPS 及其相关分子可能参与了上述的炎症抑制过程。因此,我们推测 CQ 可能通过调控 UPS 及其相关分子的表达及活性,进而抑制 LPS-TLR4 信号通路。

TRIM33 主要抑制 TGF-β 的信号级联反应[12],USP28 主要参与 DNA 的损伤修复[13],TRIM33 和 USP28 在 TLR/IL-1R 通路及 CQ 抑制 LPS 诱导巨噬细胞活化中的作用尚不明确。A20 参与下调 TLR/IL-1R 诱导 NF-κB 的活化和促炎性细胞因子的释放[14-15],因此选择 A20 进行后续 siRNA 干扰对 CQ 抗炎活性的影响。

锌指蛋白 A20(zinc finger protein A20),又名 TNF-α 诱导蛋白 3(tumor necrosis factor a inducing protein 3,TNFAIP3),是细胞凋亡研究中发现的一种肿瘤坏死因子应答基因的编码产物[16],属于卵巢肿瘤家族去泛素化酶,其 N 端含半胱氨酸蛋白酶的 DUB 结构域 OTU,C 端由具有 E3 泛素连接酶活性的锌指结构组成,因此 A20 既具有泛素化活性,又有去泛素化功能[17]。后来的研究表明 A20 不仅可抑制血管内皮细胞的 NF-κB 活性[18],抑制 TNF/TNFR 介导的细胞凋亡[18],而且可参与下调 TLR/IL-1R 诱导 NF-κB 的活化和促炎性细胞因子的释放[14-15]。A20 是 NF-κB 依赖性表达,当 NF-κB 被大量活化时,A20 与 NEMO(IKKγ)的结合可抑制 IKK 和 IκB 的磷酸化,从而减少 NF-κB 的进一步活化起到负反馈抑制作用[19-20]。因此 A20 具有较明确的拮抗 LPS-TLR4 通路、下调 TLR/IL-1R 诱导 NF-κB 活化的活性,那么 CQ 是否通过 A20 抑制 LPS 诱导巨噬细胞的活化呢?我们研究发现抗疟药 CQ 可明显增加 LPS 刺激巨噬细胞中 A20 的 mRNA 和蛋白表达,而 siRNA 干扰 A20 基因表达,CQ 抑制 LPS 诱导炎性因子 TNF-α 的 mRNA 表达不明显,因此 A20 参与 CQ 下调 LPS 刺激巨噬细胞中促炎细胞因子的 mRNA 表达,应用 siRNA 转染技术沉默 A20 基因表达,可增加 CQ 预处理细胞中 TNF 的 mRNA 表达,提示 A20 可能是 CQ 抑制 LPS 炎症反应的一个靶点。

同时,本研究还发现 CQ 不仅可显著上调 TRIM33 的 mRNA 和蛋白表达,而且可增加 USP28 的 mRNA 表达。TRIM33 通过破坏 SMAD 复合物与 TGF-β 应答基因启动子的结合而负调控 TGF-β 通路[12],而 USP28 与细胞周期蛋白结合调节 Myc 基因的稳定性而参与 DNA 的损伤修复[13]。但 TRIM33 和 USP28 在炎症和 LPS-TLR4 通路的作用不明确,本研究我们发现 CQ 可增加 LPS 诱导 Raw264.7 细胞中 TRIM33 的 mRNA 和

蛋白表达,及 USP28 的 mRNA 表达,因此 TRIM33 和 USP28 可能也参与 CQ 抑制 LPS 活化和 TLR/IL-1R 通路调控过程,但具体调控机制有待进一步研究。

本研究发现 CQ 可能通过 UPS 相关分子如 A20、TRIM33 和 USP28 的表达上调从而实现对 LPS-TLR4 通路活化的抑制,且 A20 参与 CQ 抑制 LPS 诱导巨噬细胞的活化过程,但 TRIM33 和 USP28 在 CQ 抑制 LPS-TLR4 通路中的具体调控机制及其相互联系仍有待进一步的研究。

参考文献:

[1] Munford R S, Pugin J. Normal responses to injury prevent systemic inflammation and can be immunosuppressive[J]. Am J Respir Crit Care Med, 2001, 163(2): 316 - 321. DOI:10.1164/ajrccm. 163.2. 2007102

[2] Lu Y C, Yeh W C, Ohashi P S. LPS/TLR4 signal transduction pathway[J]. Cytokine, 2008, 42(2): 145 - 151. DOI: 10.1016/j.cyto.2008.01.006

[3] 郑江, 郑新川. 以细菌主要病原体相关分子为靶标的脓毒症防治策略[J]. 第三军医大学学报, 2016, 38(4): 323 - 329.

[4] Wang J, Maldonado M A. The ubiquitin-proteasome system and its role in inflammatory and autoimmune diseases[J]. Cell Mol Immunol, 2006, 3(4): 255 - 261.

[5] 许国莹. 信号分子 TRAF6 的研究讲展[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2010, 26(12): 1326 - 1328.

[6] Wang G, Gao Y, Li L, *et al*. K63-linked ubiquitination in kinase activation and cancer[J]. Front Oncol, 2012, 2: 5. DOI:10.3389/fonc.2012. 00005

[7] Hong Z, Jiang Z, Liangxi W, *et al*. Chloroquine protects mice from challenge with CpG ODN and LPS by decreasing proinflammatory cytokine release[J]. Int Immunopharmacol, 2004, 4(2): 223 - 234. DOI:10.1016/j.intimp.2003.12.006

[8] 王艳艳, 郑江. LPS-TLR4 复合物内化障碍与 LPS 介导巨噬细胞活化的实验研究[J]. 重庆医学, 2011, 40(23): 2291 - 2293,2296.

[9] 王艳艳, 刘鑫, 曹红卫, 等. 氯喹对脂多糖/内毒素诱导的 RAW264.7 细胞 TLR4-MyD88 非依赖信号转导途径的抑制作用[J]. 第三军医大学学报, 2010, 32(9): 869 - 873.

[10] Long Y, Liu X, Wang N, *et al*. Chloroquine attenuates LPS-mediated macrophage activation through miR-669n-regulated SENP6 protein translation[J]. Am J Transl Res, 2015, 7(11): 2335 - 2345.

[11] 李权, 王亚旭, 申海鹰, 等. 腺苷干预人结直肠癌 SW480 细胞 RECK 基因甲基化及其机制[J]. 第三军医大学学报, 2015, 37(1):46 - 50. DOI:10.16016/j. 1000 - 5404. 201408020

[12] Dupont S, Mamidi A, Cordenonsi M, *et al*. FAM/USP9x, a deubiquitinating enzyme essential for TGFbeta signaling, controls Smad4 monoubiquitination[J]. Cell, 2009, 136(1): 123 - 135. DOI:10.1016/j.cell. 2008.10.051

[13] Zhang D, Zaugg K, Mak T W, *et al*. A role for the deubiquitinating enzyme USP28 in control of the DNA-damage response[J]. Cell, 2006, 126(3): 529 - 542. DOI:10.1016/j.cell.2006.06.039

[14] Boone D L, Turer E E, Lee E G, *et al*. The ubiquitin-modifying enzyme A20 is required for termination of Toll-like receptor responses[J]. Nat Immunol, 2004, 5(10): 1052 - 1060. DOI:10.1038/ ni1110

[15] 俞雯雯, 史丽云. 泛素化调控与中药抗炎[J]. 医学综述, 2014, 20(21): 3843 - 3846. DOI: 10.3969/j.issn.1006-2084.2014.21.002.

[16] Dixit V M, Green S, Sarma V, *et al*. Tumor necrosis factor-alpha induction of novel gene products in human endothelial cells including a macrophage-specific chemotaxin[J]. J Biol Chem, 1990, 265(5): 2973 - 2978.

[17] Wertz I E, O'Rourke K M, Zhou H, *et al*. De-ubiquitination and ubiquitin ligase domains of A20 downregulate NF-kappaB signalling[J]. Nature, 2004, 430(7000): 694 - 699. DOI:10.1038/nature02794

[18] 姚丹, 龚开政, 张振刚. 锌指蛋白 A20 与心血管疾病的研究进展[J]. 中华临床医师杂志:电子版, 2014, 8(13): 2494 - 2498. DOI: 10.3877/cma.j.issn. 1674-0785. 2014. 13.027

[19] 左云龙, 匡凤梧, 吴丽娟. A20 的泛素修饰抑制 NF-κB 活性[J]. 重庆医科大学学报, 2007, 32(5): 552 - 553, 557. DOI:10.3969/j.issn. 0253-3626. 2007. 05.032

[20] Hutti J E, Turk B E, Asara J M, *et al*. IkappaB kinase beta phosphorylates the K63 deubiquitinase A20 to cause feedback inhibition of the NF-kappaB pathway[J]. Mol Cell Biol, 2007, 27(21): 7451 - 7461. DOI: 10.1128/MCB.01101-07

(**收稿**:2015-12-31;**修回**:2016-02-17)

(编辑 王 红)