doi:10.11659/jjssx.09E020111

·基础研究·

敲低干细胞关键转录因子 FoxD3 对胃癌细胞 SGC-7901 的影响

刘世光[1],田伶伶[1],史冬梅[1],王 聪[2],刘 聪[3] (1.辽阳市中心医院肿瘤内科,辽宁 辽阳 111000;2.辽宁省肿瘤医院肿瘤内科,辽宁 沈阳 110000;3.铁岭市中心医院肿瘤内科,辽宁 铁岭 112000)

[摘 要] **目的** 探究 shRNA FoxD3 对胃癌细胞 SGC-7901 生长、运动及上皮间质转化的影响。**方法** 将 shRNA FoxD3 载体和空质粒载体转染至 SGC-7901 细胞,根据处理方式不同,将细胞分为 Control 组、shRNA-NC 组和 FoxD3-shRNA2 组。克隆形成实验检测细胞克隆形成率;Transwell 检测侵袭细胞数;划痕实验检测细胞划痕愈合率;显微镜观察上皮间质转化形态学变化;Western blot 检测 Ki67、增殖细胞核抗原(PCNA)、上皮钙黏蛋白(E-cadherin)、神经钙黏蛋白(N-cadherin)、波形蛋白(Vimentin)蛋白表达水平。**结果** 与 Control 组比较,FoxD3-shRNA2 组克隆形成率降低($P<0.05$),Ki67、PCNA 蛋白表达降低($P<0.05$),侵袭细胞数减少($P<0.05$),划痕愈合率降低($P<0.05$),上皮间质转化受到抑制,E-cadherin 蛋白表达升高($P<0.05$),N-cadherin 和 Vimentin 蛋白表达降低($P<0.05$)。**结论** shRNA FoxD3 可抑制 SGC-7901 细胞的增殖、侵袭、迁移和上皮间质转化。

[关键词] 胃癌;叉头框蛋白 D3;增殖;上皮间质转化

[中图分类号] R735.2 [文献标识码] A [收稿日期] 2020-09-25

Effect of knockdown of key transcription factor FoxD3 on gastric cancer cell line SGC-7901

LIU Shi-guang[1], TIAN Ling-ling[1], SHI Dong-mei[1], WANG Cong[2], LIU Cong[3] (1. Department of Medical Oncology, Liaoyang Central Hospital, Liaoyang Liaoning 111000, China; 2. Department of Medical Oncology, Liaoning Cancer Hospital, Shenyang Liaoning 110000, China; 3. Department of Medical Oncology, Tieling Central Hospital, Tieling Liaoning 112000, China)

Abstract: Objective To investigate the effect of shRNA FoxD3 on the growth, motility and epithelial-mesenchymal transformation of gastric cancer cell line SGC-7901. **Methods** The shRNA FoxD3 vector and empty plasmid vector were transfected into SGC-7901 cells, and the cells were divided into the Control group, the shRNA-NC group and the FoxD3-shRNA2 group according to different treatment methods. The rate of cell clone formation was detected by clonal formation assay; the number of invaded cells were detected by Transwell; the cell scratch healing rate was detected by scratch test; the morphological changes of epithelial-mesenchymal transformation was observed under microscope; the protein expression levels of Ki67, proliferating cell nuclear antigen (PCNA), E-cadherin, N-cadherin and Vimentin were detected by Western blot. **Results** Compared with the Control group, the FoxD3-shRNA2 group had lower rate of cell clone formation ($P<0.05$), lower protein expression of Ki67 and PCNA ($P<0.05$), less invaded cells ($P<0.05$), and lower scratch healing rate ($P<0.05$). And the epithelial-mesenchymal transformation in the FoxD3-shRNA2 group was inhibited and the protein expression of E-cadherin was increased ($P<0.05$), while the protein expressions of N-cadherin and Vimentin were decreased in the FoxD3-shRNA2 group compared with those in the Control group ($P<0.05$). **Conclusion** ShRNA FoxD3 can inhibit the proliferation, invasion, migration and epithelial-mesenchymal transformation of SGC-7901 cells.

Keywords: gastric cancer; Forkhead box D3; proliferation; epithelial-mesenchymal transformation

[基金项目] 辽宁省自然科学基金(20180550046)

[通信作者] 刘世光,E-mail:Lsg565363@163.com

[23] Smith GM, Gallo G. The role of mitochondria in axon development and regeneration[J]. Dev Neurobiol, 2018, 78: 221 – 237. doi: 10.1002/dneu.22546.

[24] Ma ZJ, Lu L, Yang JJ, et al. Lariciresinol induces apoptosis in HepG2 cells via mitochondrial-mediated apoptosis pathway [J]. Eur J Pharmacol, 2018, 821: 1 – 10. doi: 10.1016/j.ejphar.2017.12.027.

[25] Wang J, Dong Y, Li Q. Neferine induces mitochondrial dysfunction to exert anti-proliferative and anti-invasive activities on retinoblastoma [J]. Exp Biol Med (Maywood), 2020, 245(15): 1385 – 1394. doi: 10.1177/1535370220928933.

[26] Smith GM, Gallo G. The role of mitochondria in axon development and regeneration[J]. Dev Neurobiol, 2018, 78(3): 221 – 237. doi: 10.1002/dneu.22546.

[27] Zhang M, Zhang P, Zhang C, et al. Prognostic significance of Bcl-2 and Bax protein expression in the patients with oral squamous cell carcinoma[J]. J Oral Pathol Med, 2009, 38(3): 307 – 313. doi: 10.1111/j.1600 – 0714.2008.00689.x.

[28] Li S, Zhang S, Chen J. c-Myc induced upregulation of long non-coding RNA SNHG16 enhances progression and carcinogenesis in oral squamous cell carcinoma[J]. Cancer Gene Ther, 2019, 26(11 – 12): 400 – 410. doi: 10.1038/s41417 – 018 – 0072 – 8.

(编辑:龙小芬)

胃癌是一种起源于胃黏膜上皮的消化系统恶性肿瘤,发病率居所有恶性肿瘤的第5位[1]。胃癌根据癌灶部位分为胃底贲门癌、胃体癌、胃窦癌等[2]。当前胃癌的治疗方案主要包括手术和化学治疗,但术后辅助化学治疗长期治疗效果并不理想,据报道大约50%的胃癌手术患者肿瘤会复发[3],且不良反应多,耐药率高,中位总生存期不尽如人意[4]。因此,传统的胃癌治疗方案不能满足临床需求,必须探索新的治疗方法。

在胃癌的研究进展中,已经发现了许多与胃癌发生、发展、侵袭和转移有关的蛋白,但却很少被实际应用于临床,因此,加强对功能基因应用的研究将有益于胃癌治疗策略的制定。叉头框蛋白D3(Forkhead box D3,FoxD3)是FOX家族成员之一,具有保持胚胎干细胞多能性,调节肿瘤的增殖、侵袭、血管形成和迁移的作用,且在多种肿瘤中异常表达[5-6]。已有研究表明FoxD3在胃癌组织中高表达,并可能通过Wnt/β-catenin信号促进胃癌的发生发展[7]。但FoxD3在胃癌中的具体作用机制仍不清楚。本文通过干扰FoxD3,探讨其对胃癌细胞SGC-7901生长、运动及上皮间质转化的影响。

1 材料与方法

1.1 试验试剂

RPMI 1640培养基(61870-127)、胎牛血清(10099-141)、胰蛋白酶(15050-057)和青—链霉素(15140-122)均购自美国赛默飞世尔科技公司;永生化胃黏膜上皮细胞系GES和人胃腺癌细胞SGC-7901购自美国典型培养物保藏中心;二辛可宁酸(bicinchoninic acid,BCA)蛋白浓度测定试剂盒(P0012S)购自上海碧云天生物技术研究所;Transwell(3374)购自美国Corning公司;兔抗FoxD3(ab64807)、Ki67(ab15580)、增殖细胞核抗原(proliferating cell nuclear antigen,PCNA,ab18197)、上皮钙黏蛋白(E-cadherin,ab15148)、神经钙黏蛋白(N-cadherin,ab18203)、波形蛋白(Vimentin,ab137321)、β-actin(ab8227)单克隆抗体购自英国Abcam公司。

1.2 细胞培养

将GES细胞和SGC-7901细胞置于37 ℃、5% CO_2恒温培养箱中用高糖RPMI 1640培养基(含10%胎牛血清和1%青—链霉素)培养,每3 d更换1次培养基,收集细胞时用0.25%胰蛋白酶消化,试验选用对数生长期细胞。

1.3 细胞处理及分组

设计3条不同的shRNA序列干扰片段(FoxD3-shRNA1、FoxD3-shRNA2和FoxD3-shRNA3)转染至SGC-7901细胞干扰FoxD3表达。通过Western blot和RT-PCR实验选择最佳干扰序列shRNA2进行后续实验。细胞随机分为Control组、shRNA-NC组和FoxD3-shRNA2组。Control组不作处理,shRNA-NC组转染空质粒,FoxD3-shRNA2组转染shRNA2。

1.4 RT-PCR检测相关mRNA表达

用TRIzol法从各组SGC-7901细胞中提取总RNA,于37 ℃、5% CO_2恒温培养箱中培养,使用Fast-King RT试剂盒通过标准反应进行mRNA的逆转录,使用Fast qPCR Mix进行实时PCR,反应条件为:95 ℃ 2 min,95 ℃ 15 s,55 ℃ 30 s,72 ℃ 15 s。FoxD3-shRNA1 F:5'-AGCAAGCCCAAGAATAGC-3',R:5'-TCCAGGGTCCAGTAGTTG-3';FoxD3-shRNA2 F:5'-AGCGCCAGCGATATGTCCG-3',R:5'-TGCCAGGGCTTGCGGTTGA-3';FoxD3-shRNA3 F:5'-ACTCTGCCTCTCCCCAATTT-3',R:5'-CCATCCCCACGGTACTAAGA-3';β-actin F:5'-GTGGGGCGCCCCAGGCACCA-3',R:5'-CTTCCTTAATGTCACGCACGATTTC-3'。以β-actin为内参,用$2^{-\Delta\Delta CT}$方法进行定量计算。

1.5 克隆形成法检测细胞克隆形成率

将SGC-7901细胞接种至6孔板,每孔约500个细胞,培养7 d后弃掉上清液,4%多聚甲醛固定20 min,0.1%结晶紫染色15 min,洗净干燥后于显微镜下观察各组克隆形成数目,计算克隆形成率。细胞克隆形成率(%)=细胞克隆总数/接种细胞数×100%。

1.6 Transwell检测侵袭细胞数

取无血清培养基稀释的人工基底膜,加入Transwell上室,37 ℃风干。取对数生长期的SGC-7901细胞,上室中加入200 μL细胞悬液,下室中加500 μL含血清的RPMI 1640培养基。37 ℃、5% CO_2下培养24 h,棉签擦去基质胶和上室细胞,多聚甲醛固定后染色。光学显微镜下计数并拍照,每个样本随机选取5个视野。

1.7 划痕实验检测细胞划痕愈合率

按1.3所述方法分组处理SGC-7901细胞后,将细胞接种于6孔板,当细胞长满约80%时用中枪头垂直于6孔板水平划线,PBS缓冲液清洗3次后,加入无血清的培养基于37 ℃、5% CO_2培养箱中培养24 h后取样拍照。划痕愈合率=(0 h划痕宽度-24 h划痕宽度)/0 h划痕宽度×100%。

1.8 上皮间质转化形态学观察

取各组对数生长期细胞,通过显微镜观察各组细胞上皮间质转化形态学变化。

1.9 Western blot 检测相关蛋白表达

各组细胞加入含蛋白酶抑制剂的细胞裂解液提取总蛋白,BCA 法测定蛋白含量。SDS-PAGE 凝胶电泳分离蛋白转移至 PVDF 膜。4 ℃下加入 FoxD3、Ki67、PCNA、E-cadherin、N-cadherin、Vimentin 一抗(1∶1 000)孵育过夜,TBST 清洗后加入 HRP-IgG(1∶10 000),加入电化学发光显色液显色。以 β-actin 为内参,Image J V 1.8.0.112 软件分析各组细胞目的蛋白与 β-actin 比值。

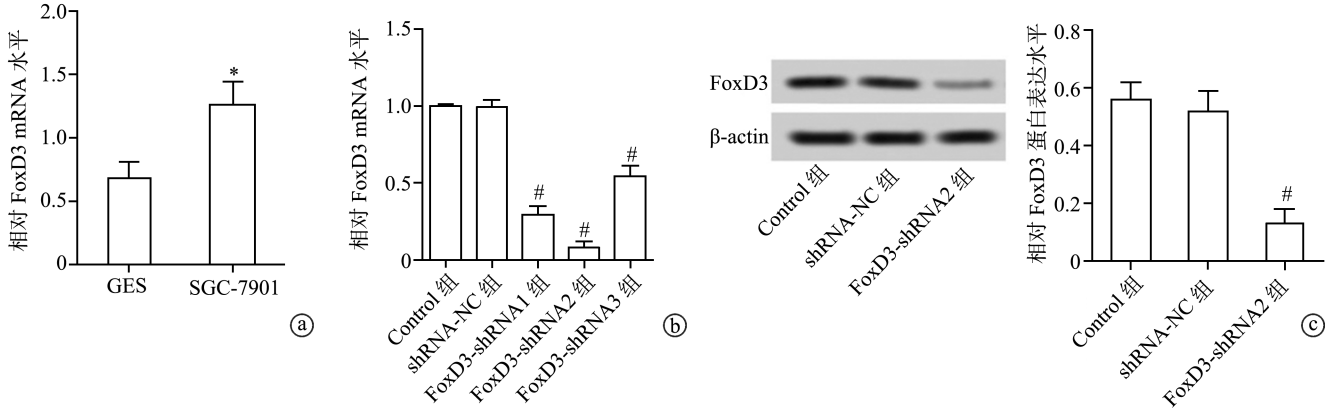
1.10 统计学分析

使用 GraphPad Prism 5 进行统计学分析,试验数据以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,2 组间比较采用 t 检验,多组间比较采用单因素方差分析。$P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 FoxD3 mRNA 和蛋白表达水平

与 GES 细胞比较,SGC-7901 细胞中 FoxD3 mRNA 水平升高,差异有统计学意义($P<0.05$),见图 1a;与 Control 组比较,FoxD3-shRNA1 组、FoxD3-shRNA2 组、FoxD3-shRNA3 组细胞中 FoxD3 mRNA 水平均降低,FoxD3-shRNA2 组 mRNA 水平最低,差异有统计学意义($P<0.05$),见图 1b。选择最佳干扰序列 shRNA2 进行后续实验,结果显示,与 Control 组比较,FoxD3-shRNA2 组 FoxD3 蛋白水平降低,差异有统计学意义($P<0.05$),见图 1c。



a:RT-PCR 检测 GES 细胞和 SGC-7901 细胞中 FoxD3 mRNA 水平;b:RT-PCR 检测 3 个 FoxD3 shRNA 中 FoxD3 mRNA 水平;c:Western blot 检测 FoxD3 蛋白表达水平 *:与 GES 细胞比较,$P<0.05$;#:与 Control 组比较,$P<0.05$

图 1 FoxD3 mRNA 和蛋白表达水平

2.2 shRNA-FoxD3 抑制 SGC-7901 细胞增殖

与 Control 组比较,FoxD3-shRNA2 组细胞克隆形成率降低,差异有统计学意义($P<0.05$),见图 2。

2.3 shRNA-FoxD3 下调 SGC-7901 细胞中 Ki67、PCNA 蛋白表达水平

与 Control 组比较,FoxD3-shRNA2 组 Ki67、PCNA 蛋白水平降低,差异有统计学意义($P<0.05$),见图 3。

2.4 shRNA-FoxD3 降低 SGC-7901 细胞侵袭能力

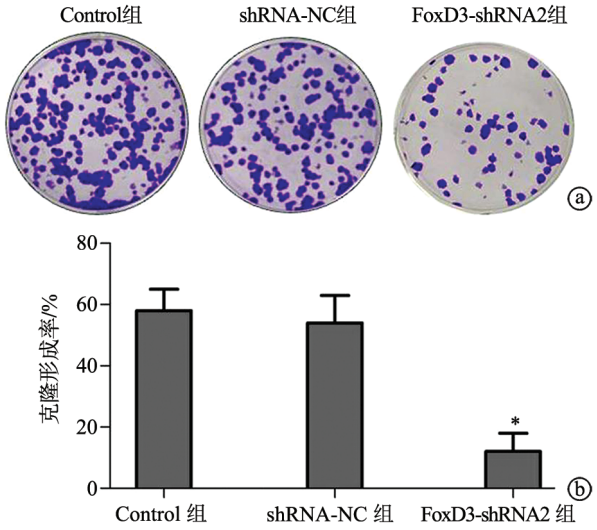
与 Control 组比较,FoxD3-shRNA2 组侵袭细胞数减少,差异有统计学意义($P<0.05$),见图 4。

2.5 shRNA-FoxD3 抑制 SGC-7901 细胞迁移

与 Control 组比较,FoxD3-shRNA2 组细胞划痕愈合率降低,差异有统计学意义($P<0.05$),见图 5。

2.6 shRNA-FoxD3 抑制 SGC-7901 细胞上皮间质转化

Control 组及 shRNA-NC 组细胞呈分散的类圆或纺锤体样,细胞之间黏附力降低,大量细胞由上皮向间质



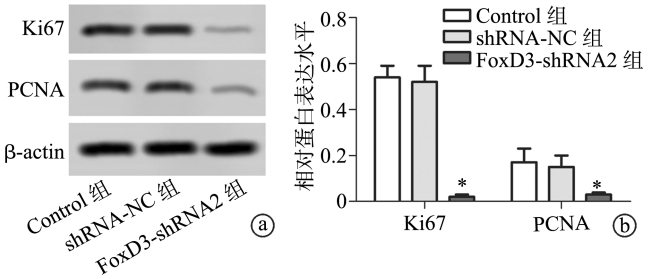
a:克隆形成实验检测各组 SGC-7901 细胞克隆情况(×200);b:半定量分析各组 SGC-7901 细胞克隆形成率 *:与 Control 组比较,$P<0.05$

图 2 shRNA-FoxD3 对 SGC-7901 细胞增殖的影响

转化,FoxD3-shRNA2 组细胞排列紧密,少数细胞呈间质细胞形态,与 Control 组比较,FoxD3-shRNA2 组上皮间质转化受到抑制,见图 6。

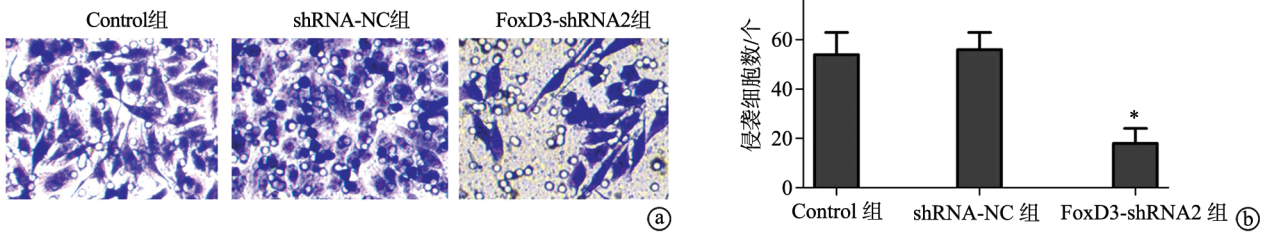
2.7 shRNA-FoxD3 上调 SGC-7901 细胞中 E-cadherin 蛋白表达,下调 N-cadherin、Vimentin 蛋白表达

与 Control 组比较,FoxD3-shRNA2 组 E-cadherin 蛋白表达升高,差异有统计学意义($P<0.05$);N-cadherin、Vimentin 蛋白表达降低,差异有统计学意义($P<0.05$),见图 7。



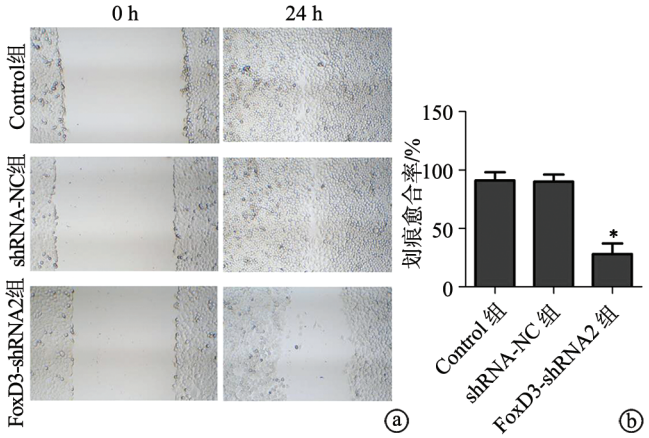
a:Western blot 检测各组 SGC-7901 细胞中 Ki67、PCNA 蛋白表达;b:半定量分析各组 SGC-7901 细胞 Ki67、PCNA 蛋白表达 *:与 Control 组比较,$P<0.05$

图 3 shRNA-FoxD3 对 SGC-7901 细胞中 Ki67、PCNA 蛋白表达水平的影响



a:Transwell 检测各组 SGC-7901 细胞侵袭细胞数(×200);b:半定量分析各组 SGC-7901 细胞侵袭细胞数 *:与 Control 组比较,$P<0.05$

图 4 shRNA-FoxD3 对 SGC-7901 细胞侵袭的影响



a:划痕实验检测各组 SGC-7901 细胞迁移(×200);b:半定量分析各组 SGC-7901 细胞划痕愈合率 *:与 Control 组比较,$P<0.05$

图 5 shRNA-FoxD3 对 SGC-7901 细胞迁移的影响

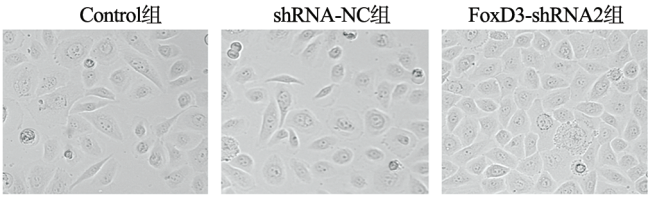
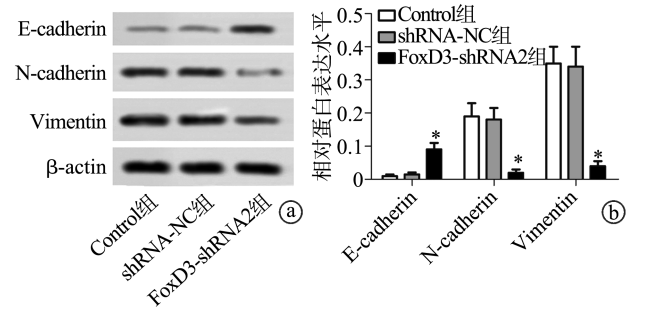


图 6 shRNA-FoxD3 对 SGC-7901 细胞上皮间质转化的影响(×200)



a:Western blot 检测各组 SGC-7901 细胞中 E-cadherin、N-cadherin、Vimentin 蛋白表达;b:半定量分析各组 SGC-7901 细胞中 E-cadherin、N-cadherin、Vimentin 蛋白表达 *:与 Control 组比较,$P<0.05$

图 7 shRNA-FoxD3 对 SGC-7901 细胞中 E-cadherin、N-cadherin、Vimentin 蛋白表达的影响

3 讨论

胃癌是具有高度侵入性和攻击性的恶性肿瘤,严重威胁人类的生命和健康[8]。寻找胃癌早期诊断及治疗的方案具有重要意义。已有研究表明,FoxD3 可预测胃癌患者的预后[9]。FoxD3 可能是继 CD44v6 的另一种特异性胃癌干细胞表面标记物,在胃癌的发生、发展、侵袭、转移、分化、增殖和凋亡中起重要作用[10]。

胃癌细胞早期就易发生转移,主要是由于胃癌细胞增殖能力极强[11]。抑制胃癌细胞增殖是控制胃癌进展的关键。Ki67 是一种增殖细胞核相关抗原,其水平高低可反映细胞的增殖状态,相关研究表明 Ki67 在胃癌组织中高表达[12]。PCNA 是一种与细胞增殖状态有关的核蛋白,随着临床分期增加和淋巴结转移的发生,其表达水平逐渐增高,可反映癌细胞增殖情况及

所处细胞周期[13]。本研究 Western blot 结果显示,转染 shRNA-FoxD3 载体后,SGC-7901 细胞中 Ki67、PCNA蛋白表达降低,提示敲低 FoxD3 表达可抑制 SGC-7901细胞增殖。

胃癌细胞的高迁移率致使患者术后易发生局部侵袭甚至转移,这也是造成胃癌患者死亡的直接原因[14]。刘四卫等[5]研究发现,FoxD3 过表达可抑制肺癌细胞增殖、迁移和侵袭。朱婧等[15]研究发现,原发性直肠癌组织中 FoxD3 蛋白表达低于正常组织,且与结肠癌肿瘤的发展及预后相关。本研究通过 Transwell 和划痕愈合实验发现,转染 shRNA-FoxD3 载体后,SGC-7901 细胞侵袭细胞数和划痕愈合率均降低,提示敲低 FoxD3 表达可抑制 SGC-7901 细胞侵袭和迁移。

上皮间质转化是正常上皮细胞转变为间质表型细胞的过程,胃癌细胞的侵袭转移及肿瘤干细胞特性与上皮间质转化过程密切相关[16]。上皮间质转化在胃癌组织和细胞中均表现为上皮细胞标志蛋白 E-cadherin 表达的降低和间充质细胞标志蛋白 N-cadherin、Vimentin 的过表达[17]。Benayoun 等[18]研究发现,FoxD3 可通过介导上皮间质转化及肿瘤干细胞的形成,维持肿瘤干细胞特性及肿瘤耐药。本研究通过 Western blot 实验发现,转染 shRNA-FoxD3 载体后,SGC-7901 细胞 E-cadherin 蛋白表达上调,N-cadherin、Vimentin 蛋白表达下调,提示敲低 FoxD3 表达可抑制 SGC-7901 细胞上皮间质转化。

综上所述,shRNA-FoxD3 具有抑制 SGC-7901 细胞增殖、侵袭、迁移和上皮间质转化的能力。敲低 FoxD3 表达对防止胃癌的进展具有重要意义。

[参考文献]

[1] Rawla P, Barsouk A. Epidemiology of gastric cancer: global trends, risk factors and prevention[J]. Prz Gastroenterol, 2019, 14(1): 26 - 38. doi: 10.5114/pg.2018.80001.

[2] Chen J, Cai R, Ren G, et al. Differences in clinicopathological characteristics and computed tomography findings between signet ring cell carcinoma and nonsignet ring cell carcinoma in early and advanced gastric cancer[J]. Cancer Med, 2018, 7(4): 1160 - 1169. doi: 10.1002/cam4.1417.

[3] Wang SQ, Xu L, Wang Q, et al. Postoperative complications and prognosis after radical gastrectomy for gastric cancer: a systematic review and meta-analysis of observational studies[J]. World J Surg Oncol, 2019, 17(1): 52. doi: 10.1186/s12957 - 019 - 1593 - 9.

[4] Peri S, Biagioni A, Cianchi F, et al. Chemotherapy resistance-associated epithelial to endothelial transition in gastric cancer[J]. J Biol Regul Homeost Agents, 2018, 32(4 Suppl 1): 30.

[5] 刘四卫,崔 玥,孙元元,等. FOXD3 在肺癌细胞中的作用[J]. 实用肿瘤学杂志,2019,33(5):390 - 396. doi:10.11904/j.issn.1002 - 3070.2018.01.001.

[6] 臧星卉,李红雨,孙 玮,等. 上皮性卵巢癌组织中 Nanog、FOXD3 mRNA 及蛋白的表达变化[J]. 山东医药,2018,57(7):54 - 56. doi:10.3969/j.issn.1002 - 266X.2018.07.015.

[7] 邹长棪,林华妹,胡 丹,等. 胃癌中 FOXD3 的表达及其与 β-catenin 表达的相关性[J]. 临床与实验病理学杂志,2020,36(2):143 - 147. doi:10.13315/j.cnki.cjcep.2020.02.004.

[8] Wang A, Wang M, Pang Q, et al. Lily extracts inhibit the proliferation of gastric carcinoma SGC-7901 cells by affecting cell cycle progression and apoptosis via the upregulation of caspase-3 and Fas proteins, and the downregulation of FasL protein[J]. Oncol Lett, 2018, 16(2): 1397 - 1404. doi: 10.3892/ol.2018.8806.

[9] Li J, Jiang Z, Han F, et al. FOXO4 and FOXD3 are predictive of prognosis in gastric carcinoma patients[J]. Oncotarget, 2016, 7(18): 25585 - 25592. doi: 10.18632/oncotarget.8339.

[10] 陈 勇,张 红,吴梦婕,等. CD44v6 和 FOXD3 在人胃癌组织中的表达及临床意义[J]. 安徽医科大学学报,2015,50(12):1795 - 1799.

[11] 杨媛媛,王文君,王潇飞,等. 硫酸右旋糖苷抑制人胃癌细胞增殖、迁移及相关因子表达的作用[J]. 实用医学杂志,2019,35(7):1057 - 1063. doi:10.3969/j.issn.1006 - 5725.2019.07.011.

[12] Min KW, Kim DH, Son BK, et al. A high Ki67/BCL2 index could predict lower disease-free and overall survival in intestinal-type gastric cancer[J]. Eur Surg Res, 2017, 58(3 - 4): 158 - 168. doi: 10.1159/000448945.

[13] 胡庆军,周 力,车筑平. 增殖细胞核抗原在胃癌中的表达及其临床意义[J]. 贵州医药,2001,25(2):113 - 115. doi:10.3969/j.issn.1000 - 744X.2001.02.007.

[14] 郭 涛,纪冬梅,李艳平,等. miR-138-5p 靶向 HIF-1α 影响人白血病 K562 细胞增殖和侵袭转移[J]. 局解手术学杂志,2020,29(4):272 - 277. doi:10.11659/jjssx.08E019001.

[15] 朱 婧,张 涛,陈晓品. FoxD3 与直肠癌患者临床病理特征的相关性研究[J]. 现代医药卫生,2019,35(6):827 - 829. doi:10.3969/j.issn.1009 - 5519.2019.06.009.

[16] 黄雅平,庄伊凡,程 晶,等. 姜黄素调控 Wnt 信号通路抑制胃癌细胞上皮间质转化的研究[J]. 局解手术学杂志,2020,29(9):703 - 707. doi:10.11659/jjssx.05E020096.

[17] 潘 骅,张 弘,黄东凤. 过表达 E-Cadherin 通过抑制 Smad-3 磷酸化对胃癌侵袭和迁移的调控作用[J]. 医学分子生物学杂志,2019,16(3):232 - 238. doi:10.3870/j.issn.1672 - 8009.2019.03.000.

[18] Benayoun BA, Caburet S, Veitia RA. Forkhead transcription factors: key players in health and disease[J]. Trends Genet, 2011, 27(6): 224 - 232. doi: 10.1016/j.tig.2011.03.003.

(编辑:魏 源)