脂糖代谢研究 DOI:10.13406/j.cnki.cyxb.001323

体内研究脂肪酸摄取新方法的建立和评估

刘 军[1],左国庆[2],阮雄中[1],陈压西[1],杨 萍[1]
(1. 重庆医科大学脂糖代谢性疾病重庆市重点实验室,重庆 400016;2. 重庆市中医院消化内科,重庆 400021)

【摘 要】**目的**:利用荧光标记的长链脂肪酸,建立一种用于评估动物外周组织游离脂肪酸摄取能力的新方法,为研究体内脂肪酸代谢提供新途径。**方法**:小鼠腹腔注射和尾静脉注射氟化硼二吡咯荧光标记脂肪酸类似物(BODIPY FL C16),荧光显微镜下观察肝脏和脂肪组织荧光强度。对肝脏和脂肪组织进行脂质抽提,并用酶标仪检测血清、肝脏和脂肪组织相对荧光强度。**结果**:腹腔和尾静脉注射 BODIPY FL C16 后均能在小鼠血清[(32 096 ± 2 053)RFU;(22 933 ± 2 430) RFU],肝脏[(40.90 ± 5.08) RFU/mg;(25.70 ± 6.53) RFU/mg]和脂肪组织[(576 ± 90) RFU/mg;(4.990 ± 0.586) RFU/mg]检测到增强的荧光信号(P=0.000);腹腔注射 BODIPY FL C16 的浓度与外周组织的荧光强度呈正相关(P=0.000);腹腔注射 BODIPY FL C16 在 30~100 min 能够维持一个相对脂肪酸代谢的稳态。**结论**:成功建立了一种体内研究荧光标记脂肪酸摄取的新方法,该方法具有稳定性、重现性,能够准确地反映外周组织脂肪酸摄取情况。

【关键词】脂肪酸;代谢性疾病;肝脏;脂肪
【中图分类号】R332 【文献标志码】A 【收稿日期】2017-02-22

Establishment and evaluation of a new method for studying fatty acid uptake *in vivo*

Liu Jun[1], *Zuo Guoqing*[2], *Ruan Xiongzhong*[1], *Chen Yaxi*[1], *Yang Ping*[1]
(*1. Chongqing Key Laboratory of Lipid and Glucose Metabolism, Chongqing Medical University;*
2. Department of Gastroenterology, Chongqing Hospital of Traditional Chinese Medicine)

【Abstract】***Objective***: To establish a new method for assessing fatty acid uptake of peripheral tissues in animals by using the fluorescence labeled long chain fatty acid, and to provide a new way to study fatty acid metabolism *in vivo*. ***Methods***: The fluorescence intensity of the liver and adipose tissue was observed under a fluorescence microscope after intraperitoneal (ip) or intravenous (iv) injection of Dipyrromethene Boron Difluoride fluorescence labeled fatty acids analog (BODIPY FL C16) in mice. While the relative fluorescence intensity of the serum, liver and adipose tissue was detected with a microplate reader. ***Results***: Enhanced

作者介绍:刘 军,Email:822201013@qq.com,
研究方向:糖脂代谢及器官损害。
通信作者:杨 萍,Email:yp_apple@yeah.net。
基金项目:国家自然科学基金资助项目(编号:81400786);重庆市科委基础与前沿研究计划资助项目(编号:cstc2015jcyjA10001)。
优先出版:http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.r.20170622.1628.030.html (2017-06-22)

[5] Miquilena-Colina ME, Lima-Cabello E, Sanchez-Campos S, et al. Hepatic fatty acid translocase CD36 upregulation is associated with insulin resistance, hyperinsulinaemia and increased steatosis in non-alcoholic steatohepatitis and chronic hepatitis C[J]. Gut, 2011, 60(10): 1394-1402.

[6] 王和峰,翟纯刚,庞文会,等. PI3K/Akt/mTOR 信号通路在巨噬细胞自噬及动脉粥样硬化斑块不稳定中的作用[J]. 中国病理生理杂志,2013,29(3):390-397.

[7] 韦 星,蔡 明,李 响,等. 阿西莫司联合小剂量阿托伐他汀治疗肾移植术后混合型高脂血症的疗效与安全性[J]. 器官移植,2015,6(6):392-396.

[8] 吴 瑜,赵 蕾,李 青,等. 高脂饮食致 C57BL/6J 小鼠脂肪组织中胰岛素受体底物蛋白 1 异常磷酸化的分子机制[J]. 重庆医科大学学报,2013,38(4):350-354.

[9] 苏凤云,刘爱军,苏定冯. 西罗莫司的药理学作用研究进展[J]. 药学实践杂志,2011,29(5):336-338.

[10] Kim JE, Chen J. Regulation of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma activity by mammalian target of rapamycin and amino acids in adipogenesis[J]. Diabetes, 2004, 53(11): 2748-2756.

[11] Porstmann T, Santos CR, Griffiths B, et al. SREBP activity is regulated by mTORC1 and contributes to Akt-dependent cell growth[J]. Cell Metab, 2008, 8(3): 224-236.

[12] 蔡旭华,朱伟华,李伟平. 西罗莫司对非酒精性脂肪肝大鼠调节性 T 细胞/辅助性 T 细胞 17 平衡的影响[J]. 中国临床药理学杂志,2017,33(1):36-39.

[13] González-Rodríguez A, Mayoral R, Agra N, et al. Impaired autophagic flux is associated with increased endoplasmic reticulum stress during the development of NAFLD[J]. Cell Death Dis, 2014, 5: e1179.

[14] Brown NF, Stefanovic-Racic M, Sipula IJ, et al. The mammalian target of rapamycin regulates lipid metabolism in primary cultures of rat hepatocytes[J]. Metabolism, 2007, 56(11): 1500-1507.

(责任编辑:张辉洁)

fluorescence intensity was observed in the serum[ip(32 096 ± 2 053) RFU;iv(22 933 ± 2 430) RFU],liver[ip(40.90 ± 5.08) RFU/mg;iv(25.70 ± 6.53) RFU/mg] and adipose tissue[ip(576 ± 90) RFU/mg;iv(4.990 ± 0.586) RFU/mg] after both ip and iv injection of BODIPY FL C16(P=0.000). The relative fluorescence intensity in the peripheral tissues was positively correlated with the concentration of the injected BODIPY FL C16(P=0.000). Besides,the BODIPY FL C16 after ip injection could maintain metabolically stable between 30 to 100 min. ***Conclusion***:A new method for investigating the fatty acid uptake in vivo by using fluorescence labeled fatty acid is successfully established. This method is stable,reproducible and can accurately reflect the ability of peripheral tissues to uptake the fatty acid.

【Key words】fatty acid;metabolic disease;liver;adipose tissue

脂肪酸代谢在过去半个多世纪一直是肥胖、脂肪肝等代谢性疾病研究中的热点[1]。细胞的脂肪酸代谢稳态包含对游离脂肪酸的摄取、脂肪酸的内源性合成、脂肪酸的β氧化及脂肪酸酯化的动态平衡[2]。肝脏是脂质代谢最旺盛的器官，也是最易发生脂质异位沉积的部位[3]。有研究结果证实，非酒精性脂肪肝（non-alcohol fatty liver disease，NAFLD）患者肝脏脂肪沉积有大约 59%来源于血循环中的游离脂肪酸[4]，提示细胞对游离脂肪酸的摄取可能是 NAFLD 等代谢性疾病发生发展中的关键环节。然而，目前对于脂肪酸摄取机制的认识仍有局限，受制于体内脂肪酸摄取模型的建立及发展。鉴于国内外对于体外脂肪酸摄取的方法学应用已日渐成熟[5]，而研究体内脂肪酸摄取的方法主要依赖于正电子发射断层显像（positron emission tomography，PET）和单光子发射计算机化断层显像（single photon emission computerized tomography，SPECT）来检测 11 碳棕榈酸和放射性元素氟-18 标记的脂肪酸类似物。由于这类方法具有放射性、价格昂贵以及检测设备要求高等特征而没有得到广泛应用[6]。因此，建立和发展一种更为简单的、价格低廉的、可广泛应用的体内研究脂肪酸摄取的新方法已迫在眉睫。与此同时，利用该方法来探讨脂肪酸在外周组织转运的机制，了解 NAFLD 等代谢性疾病的发病机制以及发现新的治疗靶点具有非常重要的意义。本研究旨在建立一种利用氟化硼二吡咯荧光标记饱和长链脂肪酸（BODIPY FL C16）来研究体内脂肪酸摄取的新方法。

1 材料和方法

1.1 实验动物

本实验小鼠均来源于重庆医科大学动物实验中心，选取雄性 8 周龄 C57BL/6J 小鼠 36 只。腹腔和尾静脉注射 BODIPY FL C16 后荧光信号检测试验小鼠（各 10 只），均随机分为对照组及 BODIPY FL C16 组（n=5）；比较腹腔注射不同浓度 BODIPY FL C16 后小鼠外周组织荧光强度：12 只试验小鼠随机分为 4 组：对照组、20 μmol/L 组、60 μmol/L 组和 200 μmol/l 组（n=3）；观察不同时间点小鼠血清中相对荧光强度的变化（共 4 只试验小鼠）。

1.2 主要实验试剂和设备

荧光标记脂肪酸（BODIPY FL C16，美国 Invitrogen 公司）；牛血清白蛋白（BSA，上海生工生物公司）；磷酸盐粉末（北京鼎国昌盛公司）；戊巴比妥钠（美国 Sigma-Aldrich 公司）；异丙醇（上海生工生物公司）；正庚烷（上海生工生物公司）；浓硫酸（重庆川东化工公司）；低温高速离心机（美国 Thermo 公司 Sorvall ST 16 型）；酶标仪（美国 BioTek 公司 H1MFD 型）；正置荧光显微镜（德国 Carl Zeiss 公司 Axio Imager A2 型）；冰冻切片机（Leica CM1950 型）；全自动样品碾磨仪（上海净信科技有限公司 TDZS-WS 型）。

1.3 方法

1.3.1 动物的处理 称取并记录各组小鼠体质量，按小鼠体质量 0.01 mL/g，用 1 mL 注射器通过小鼠腹腔注射适量 2%戊巴比妥钠溶液，对小鼠进行麻醉处理。将 BODIPY FL C16 用 PBS 配制成 4 mmol/L 的储存液，随后用 BSA 溶液以梯度稀释的方式分别配成 20、60、200 μmol/L 3 个浓度的 BODIPY FL C16 注射液，其中保证 BODIPY FL C16 摩尔浓度与 BSA 摩尔浓度比为 1:2[7]。于解剖台上固定小鼠后，用 1 mL 注射器向 BODIPY FL C16 组小鼠腹腔或者尾静脉注射 100 μL BODIPY FL C16 混合液，对照组小鼠注射 100 μL PBS 溶液，然后闭光处理。一定时间后，用组织剪以十字切口开腹，剪开膈肌开胸固定后，用 1 mL 的注射器针头在心脏 10 点钟方向穿刺入小鼠的右心房内，缓慢抽取静脉血 0.5~1.0 mL，放于备好的 1.5 mL EP 管中，室温下静置分层。取 50 mL 的注射器，并连接头皮针后在 5 点钟方向用针头刺入小鼠的左心房内后，缓慢向心房内灌注 PBS，待肝脏明显肿胀后在下腔静脉上剪一个小缺口，使循环血液从缺口中流出，继续灌注 PBS 溶液直至肝脏组织颜色变白后停止灌注。用眼科镊和眼科剪轻轻剥离出小鼠肝脏和脂肪组织，放入装有 PBS 溶液的培养皿中清洗残留血液后，用于组织冰冻切片和脂质抽提。

1.3.2 小鼠肝脏和脂肪组织荧光显像 闭光后取适量包埋后肝脏和脂肪组织于冰冻切片机上切片，厚度为 10 μm，贴于载玻片上；每张载玻片滴 10 μL 防淬灭剂，并用盖玻片封片；封片后于荧光显微镜 200 倍下拍照。

1.3.3　血液相对荧光强度的检测　取心脏血于 1.5 mL EP 管中，静置至分层后 3 000 r/min 离心 10 min；小心抽取上层血清 100 μL（血清较少可稀释）于 96 孔板中，同时用 100 μL PBS 溶液作空白对照，在酶标仪下（激发波长/发射波长=488/515）检测荧光强度。

1.3.4　肝脏和脂肪组织相对荧光强度的检测　称取 50~100 mg 肝脏和脂肪组织于 2 mL EP 管中，加入 500 μL RIPA 溶液和消毒后的磁珠，置于全自动样品碾磨仪对称位置，70 Hz，90 s 匀浆；用镊子取出磁珠后，18 000 r/min 离心 5 min；取 400 μL 上清于 2 mL EP 管中，加入 3 倍体积的 Dole's reagent 溶液（正庚烷:异丙醇:2N 硫酸=10:40:1），在上液中加入 5%的正庚烷以增加有机相，上下颠倒混匀后进行脂质抽提[8]；静置 5 min 后，18 000 r/min 离心 10 min；取上清中有机相 100 μL 于 96 孔板中，在酶标仪下（激发波长/发射波长=488/515）检测荧光强度。

1.4　统计学分析

运用 Graphpadprism 5.0 统计软件对各实验结果的数据进行统计分析，本实验所有的数据均以均数 ± 标准差（$\bar{x} \pm s$）表示。采用单因素方差分析法和 t 检验进行进一步统计分析，检验水准 α=0.05。

2　结　果

2.1　小鼠腹腔和尾静脉注射 BODIPY FL C16 后均可在外周组织中检测到荧光信号

2.1.1　腹腔注射 BODIPY FL C16 后荧光信号的检测　腹腔注射是指将药物注入动物胃肠道浆膜以外、腹膜以内的注射方式。考虑到腹腔注射后肠系膜上段静脉血液回流至门静脉，有首过效应，会导致药物的损耗，因此给予每只小鼠注射 200 μmmol/L BODIPY FL C16 100 μL，20 min 后迅速采取心脏血、肝脏和脂肪组织，肝脏和脂肪组织冰冻切片后在荧光显微镜下观察荧光强度。如图 1 所示，在肝脏和脂肪组织中 BODIPY FL C16 组的荧光强度和对照组相比明显增强。同时，通过酶标仪检测血清、肝脏和脂肪组织中的相对荧光强度，发现 BODIPY FL C16 组血清[(32 096 ± 2 053) RFU vs. (626.0 ± 59.6) RFU](t=34.27，P=0.000)、肝脏[(40.90 ± 5.08) RFU/mg vs. (4.730 ± 0.519) RFU/mg](t=14.25，P=0.000)和脂肪组织[(576 ± 90) RFU/mg vs. (2.570 ± 0.728) RFU/mg](t=15.85，P=0.000)的相对荧光单位数值都明显升高，如图 2 所示。

2.1.2　尾静脉注射 BODIPY FL C16 后荧光信号的检测　静脉注射是最直接的给药方式之一，药物直接进入血液循环，经由静脉回流心脏后再被泵出，到达全身各个部位，起效快，损耗也小。给予每只小鼠尾静脉注射 20 μmmol/L BODIPY FL C16 100 μL，5 min 后取血清、肝脏和脂肪组织。荧光显微镜和酶标仪检测方法均能观察到尾静脉注射 BODIPY FL C16 后血清[(22 933 ± 2 430) RFU vs. (846 ± 127) RFU](t=20.29，P=0.000)、肝脏[(25.70 ± 6.53) RFU/mg vs. (2.500 ± 0.534) RFU/mg](t=5.884，P=0.000)及脂肪[(4.990 ± 0.586) RFU/mg vs. (2.570 ± 0.646) RFU/mg](t=8.112，P=0.000)组织荧光强度都明显增强，如图 3、图 4 所示。

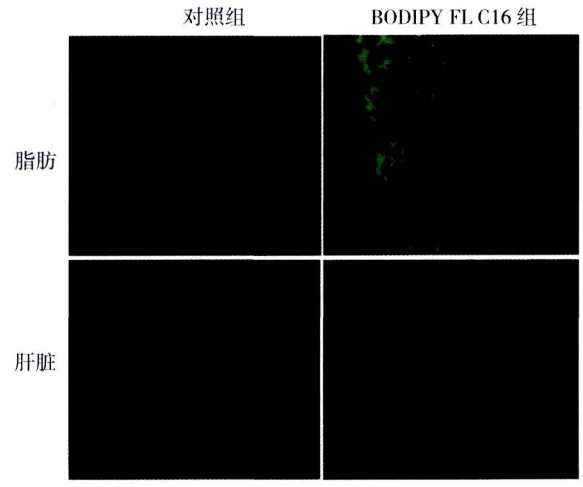
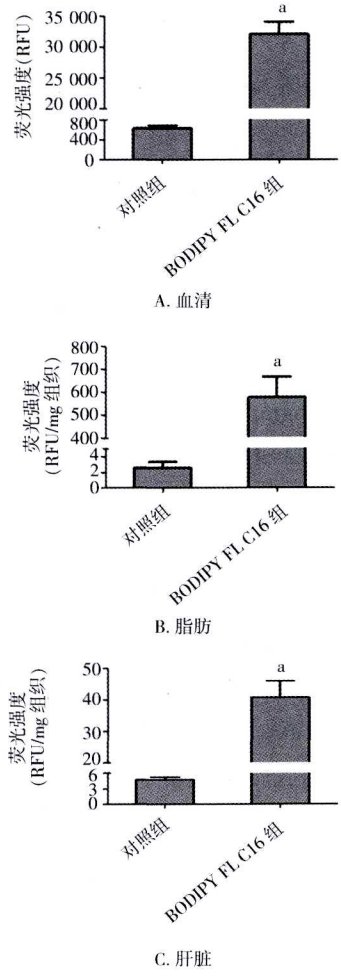


图 1　腹腔注射 BODIPY FL C16 后脂肪和肝脏组织荧光显像（200×）

Fig.1　Fluorescence micrographs of the adipose and liver tissue after ip injection of BODIPY FL C16(200×)



a：与对照组比较，P<0.05

图 2　腹腔注射 BODIP FL C16 后血清、脂肪和肝脏组织的相对荧光强度

Fig.2　Relative fluorescence intensity of the serum, adipose and liver tissue after ip injection of BODIPY FL C16

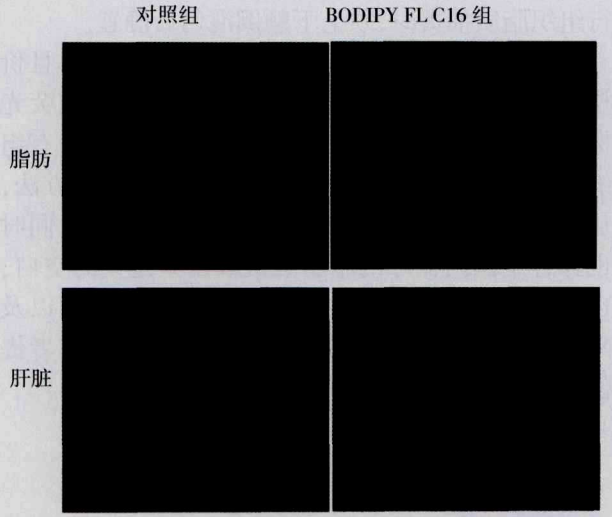
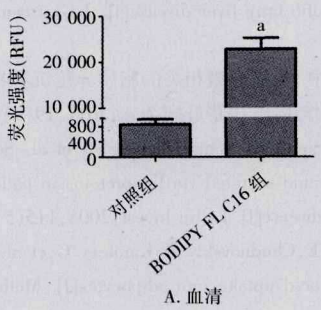
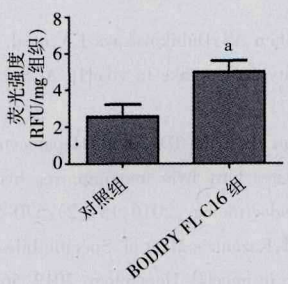


图 3　尾静脉注射 BODIPY FL C16 后脂肪和肝脏组织荧光显像（200×）

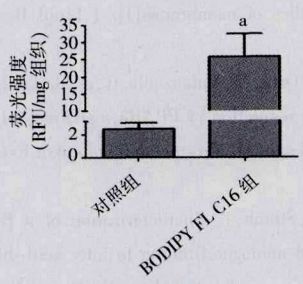
Fig.3　Fluorescence micrographs of the adipose and liver tissue after iv injection of BODIPY FL C16(200×)



A. 血清



B. 脂肪



C. 肝脏

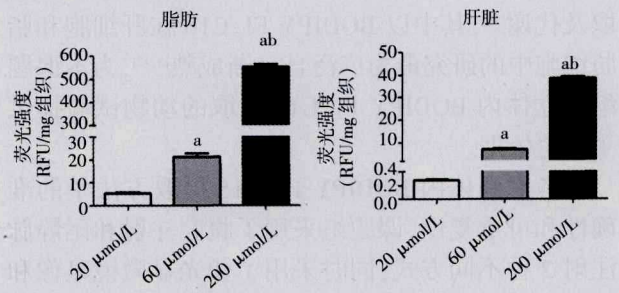
a：与对照组比较，$P<0.05$

图 4　尾静脉注射 BODIPY FL C16 后血清、脂肪和肝脏组织的相对荧光强度

Fig.4　Relative fluorescence intensity of the serum, adipose and liver tissue after iv injection of BODIPY FL C16

2.2　注射不同浓度 BODIPY FL C16 对小鼠外周组织荧光强度的影响

鉴于腹腔注射 BODIPY FL C16 后小鼠外周组织荧光强度增高更为明显，本课题组决定采用腹腔注射的方式来了解注射不同浓度 BODIPY FL C16 后外周组织荧光信号强度的变化，选取 20、60、200 μmmol/L 3 种浓度，20 min 后用酶标仪检测肝脏和脂肪组织荧光强度，肝脏组织 20 μmmol/L 组、60 μmmol/L 组、200 μmmol/L 组荧光强度分别为（0.283 ± 0.015）、（7.070 ± 0.776）、（38.600 ± 1.660）RFU/mg，脂肪组织 20 μmmol/L 组、60 μmmol/L 组、200 μmmol/L 组荧光强度分别为（5.420 ± 0.814）、（21.300 ± 2.680）、（553.000 ± 21.900）RFU/mg，可见随着 BODIPY FL C16 浓度的升高，肝脏（F=1 793，P=0.000）和脂肪组织（F=1 118，P=0.000）的荧光信号强度逐渐增强，如图 5 所示。



a：与 20 μmol/L 组比较，$P<0.05$；b：与 60 μmol/L 组比较，$P<0.05$

图 5　腹腔注射不同浓度 BODIPY FL C16 后脂肪和肝脏组织相对荧光强度

Fig.5　Relative fluorescence intensity of the adipose and liver tissue after ip injection of different doses of BODIPY FL C16

2.3　观察不同时间点小鼠血清中相对荧光强度的变化

为进一步了解在注射等量的 BODIPY FL C16 以后，不同吸收时间对血清中相对荧光强度的影响，分别在注射 20 μmmol/L BODIPY FL C16 后 0、15、30、45、60、80、100、120、180、300 min 10 个时间点比较血清中 FFA 相对荧光强度，结果如图 6 所示，血清中 FFA 的荧光强度在 0~30 min 呈现急剧增长，30~100 min 为一个相对稳定的阶段，120 min 开始下降。

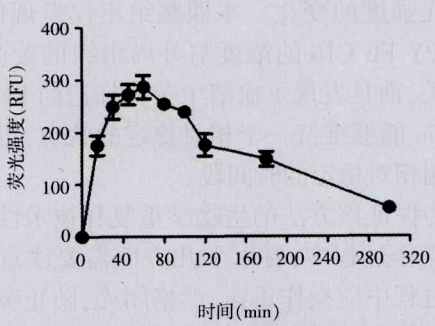


图 6　腹腔注射 BODIPY FL C16 不同时间点血清相对荧光强度

Fig.6　Relative fluorescence intensity of the serum at different time points after ip injection of BODIPY FL C16

3 讨 论

氟化硼二吡咯（dipyrromethene boron difluoride，BODIPY）荧光物质是一类新兴的染料，具有高的荧光量子产率、高的摩尔消光系数、良好的光稳定性、对 pH 不敏感等优点[9]。长链脂肪酸（long-chain fatty acid，LCFA）是合成磷脂、甘油三酯和胆甾醇酯类的主要原料之一，同时也是能量代谢反应的底物[10]，了解细胞 LCFA 的摄取和转运机制对于理解 NAFLD 等代谢性疾病的发病机制以及发现新的治疗靶点具有重大意义。近年来，BODIPY 标记脂肪酸类似物已经成为一个非常有用的工具研究细胞脂肪酸摄取及代谢[11]，其中以 BODIPY FL C16 在肝细胞和脂肪细胞中的研究最为广泛且日渐成熟[5,12]，为本课题组建立体内 BODIPY FL C16 摄取的动物试验提供了理论依据。

考虑到体内 BODIPY FL C16 摄取方法学的准确性和可重复性，课题组采用了腹腔注射和尾静脉注射 2 种不同方式，同时采用了荧光显微镜显像和酶标仪检测相对荧光强度 2 种方法来增加试验结果的真实性，结果显示无论是腹腔注射还是尾静脉注射都能够在外周组织检测出增强的荧光信号。由于 2 种注射方式在体内的代谢途径不同，从实验结果也可以看出，腹腔注射 BODIPY FL C16 主要摄取组织为脂肪组织，而尾静脉注射 BODIPY FL C16 主要摄取组织为肝脏，因此试验过程中可根据具体的试验条件和目的选择注射方式。由于腹腔注射 BODIPY FL C16 后小鼠肝脏和脂肪组织荧光强度均呈数量级增加，同时在动物实验中腹腔注射应用更为广泛，因此课题组采用了腹腔注射的方式来研究不同浓度 BODIPY FL C16 对小鼠外周组织荧光强度的影响和同一浓度不用时间点小鼠血清中相对荧光强度的变化。本课题组不仅发现体内注射 BODIPY FL C16 的浓度与外周组织的荧光强度呈正相关，而且发现了血清中荧光标记的 FFA 在 30~100 min 能够维持一个相对稳定的状态，提示脂肪酸代谢相对稳定的时间段。

为保证该方法的生物学重复和技术性重复，在实际操作过程中，有以下几方面需要注意：①整个实验过程中应操作迅速，严格闭光，防止荧光降解；②小鼠须麻醉后在相同解剖学位置注射等量 BODIPY FL C16；③选取相同解剖学位置的肝脏和脂肪组织进行荧光强度检测；④用 Dole's reagent 溶液进行组织脂质抽提时，须上下颠倒混匀后静置。

综上所述，本研究旨在建立一种更为简单且价格低廉的研究体内脂肪酸摄取的方法，在细胞荧光标记脂肪酸摄取实验的基础上建立了有结构、有组织、有系统的体内荧光标记脂肪酸摄取的新方法，从而更加真实地模拟人体脂肪酸代谢和稳态，同时也弥补了国内在体内脂肪酸摄取模型建立的空白，也为广大研究脂肪酸在外周组织的转运机制以及 NAFLD 等代谢性疾病的发病机制的科研工作者提供了新的曙光。

参 考 文 献

[1] Jensen MD, Haymond MW, Rizza RA, et al. Influence of body fat distribution on free fatty acid metabolism in obesity[J]. J Clin Invest, 1989, 83(4): 1168-1173.

[2] Kawano Y, Cohen DE. Mechanisms of hepatic triglyceride accumulation in non-alcoholic fatty liver disease[J]. J Gastroenterol, 2013, 48(4): 434-441.

[3] 陈亚西，阮雄中. 炎症应激相关的脂质异位沉积在非酒精性脂肪性肝病发病中的作用[J]. 中华肝病杂志，2011，19(9)：643-645.

[4] Donnelly KL, Smith CI, Schwarzenberg SJ, et al. Sources of fatty acids stored in liver and secreted via lipoproteins in patients with non-alcoholic fatty liver disease[J]. J Clin Invest, 2005, 115(5): 1343-1351.

[5] Dubikovskaya E, Chudnovskiy R, Karateev G, et al. Measurement of long-chain fatty acid uptake into adipocytes[J]. Methods Enzymol, 2014, 538: 107-113.

[6] Henkin AH, Cohen AS, Dubikovskaya EA, et al. Real time non invasive imaging of fatty acid uptake in vivo[J]. ACS Chem Biol, 2012, 7(11): 1884-1891.

[7] Wilson CG, Tran JL, Erion DM, et al. Hepatocyte-specific disruption of CD36 attenuates fatty liver and improves insulin sensitivity in HFD-fed mice[J]. Endocrinology, 2016, 157(2): 570-585.

[8] Nie B, Park HM, Kazantzis M, et al. Specific bile acids inhibit hepatic fatty acid uptake in mice[J]. Hepatology, 2012, 56(4): 1300-1310.

[9] Boldyrev IA, Zhai X, Momsen MM, et al. New BODIPY lipid probes for fluorescence studies of membranes[J]. J Lipid Res, 2007, 48(7): 1518-1532.

[10] Echeverría F, Ortiz M, Valenzuela R, et al. Long-chain polyunsaturated fatty acids regulation of PPARs, signaling: relationship to tissue development and aging[J]. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids, 2016, 114: 28-34.

[11] Thumser AE, Storch J. Characterization of a BODIPY-labeled fluorescent fatty acid analogue. Binding to fatty acid-binding proteins, intracellular localization, and metabolism[J]. Mol Cell Biochem, 2007, 299(1-2): 67-73.

[12] Somwar R, Roberts CT Jr, Varlamov O. Live-cell imaging demonstrates rapid cargo exchange between lipid droplets in adipocytes[J]. FEBS Lett, 2011, 585(12): 1946-1950.

（责任编辑：张辉洁）