

· 基础研究 ·

三氧化二砷对人肾癌细胞 786-O 增殖及其 PI3K-Akt 转导途径的影响

朱峰¹, 张艳², 何岩¹, 张会清¹, 张英杰¹

(1. 新乡医学院第一附属医院泌尿外科, 河南新乡 453100; 2. 新乡医学院基础医学院生理学教研室, 河南新乡 453001)

摘要:目的 评价三氧化二砷对人肾癌细胞 786-O 增殖的影响, 并探讨磷酸肌醇 3 激酶(PI3K)-蛋白激酶 B(Akt) 信号途径的变化情况。**方法** 96 孔板培养人肾癌细胞 786-O, 并分成对照组和实验组, 每组 45 个孔。加入 1 μ M 三氧化二砷和生理盐水之后分别于 0、12、24 h 取出 15 个孔的细胞, 使用 BrdU 实验检测每孔细胞 DNA 合成量, 使用荧光定量聚合酶链反应检测 PI3K 和 Akt 相对 mRNA 表达量, 使用免疫印迹法检测细胞内 PI3K 和 Akt 的相对表达量。**结果** 三氧化二砷刺激 12、24 h 后, 观察组 DNA 合成量逐渐低于 0 h 时的 DNA 合成量, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 且均显著低于 12、24 h 的对照组 DNA 合成量, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。在 0、12 h 和 24 h 时观察组细胞内 PI3K 和 Akt mRNA 和蛋白的相对表达量差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 而对照组细胞内 PI3K 和 Akt mRNA 和蛋白的相对表达量随着细胞增殖加快逐渐升高。**结论** 三氧化二砷可能通过抑制 PI3K-Akt 转导途径来抑制人肾癌细胞 786-O 增殖, 且具有治疗人肾癌的潜在临床价值。

关键词: 砷剂; 肾肿瘤; PI3K; Akt

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2013.26.026

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2013)26-3145-04

Effects of As₂O₃ on human renal carcinoma cell line 786-O proliferation and PI3K-Akt transduction pathwayZhu Feng¹, Zhang Yan², He Yan¹, Zhang Huiqing¹, Zhang Yingjie¹

(1. Department of Urological Surgery, First Affiliated Hospital, Xinxiang Medical College, Xinxiang, Henan 453100, China; 2. Teaching and Research Section of Physiology, Basic Medical College, Xinxiang Medical College, Xinxiang, Henan 453001, China;)

Abstract: Objective To evaluate the effect of arsenic trioxide(As₂O₃) on the proliferation of human renal carcinoma cell line 786-O, and to explore the changes of the PI3K-Akt signaling pathway. **Methods** Human renal cancer cells 786-O was cultured in 96-well plates, and divided into the control group ($n = 45$ holes) and the experimental group ($n = 45$ holes). After stimulation by 1 μ M As₂O₃ and saline, the cells in 15 holes were collected at 0, 12, and 24 h. BrdU assay was performed to quantify DNA synthesis to evaluate the cells proliferation, the quantitative PCR was used to measure PI3K and Akt relative mRNA expression, and Western blot was used to quantify the relative expression levels of intracellular PI3K and Akt. **Results** After 12, 24 h of As₂O₃ stimulation, the amount of DNA synthesis in the observation group was gradually lower than that of the DNA synthesis at 0 h ($P < 0.05$) and significantly lower than that of the control group at 12 h and 24 h ($P < 0.05$). At 0, 12, 24 h, the relative expression level of intracellular PI3K and Akt mRNA and protein in the observation group had no significant difference ($P > 0.05$), and the relative expression levels of PI3K and Akt mRNA and protein in the control group were increased as the proliferation was gradually increased.

Conclusion As₂O₃ inhibits human renal carcinoma cell line 786-O proliferation through inhibiting the PI3K-Akt transduction pathway, and has potential clinical value for the treatment of kidney cancer.

Key words: arsenicals; kidney neoplasms; PI3K; Akt

肾癌是肿瘤始发于泌尿小管上皮, 逐渐进入肾盂、肾盏, 甚至输尿管, 且主要以血尿、腰痛和腹部肿块等“肾癌三联征”为主要临床特征的一类疾病。肾癌约是成人最常见的肾脏肿瘤。男女比例约为 2:1, 可见于各个年龄段, 高发年龄 50~70 岁。三氧化二砷可伤害神经系统、影响毛细血管通透性, 对皮肤和黏膜有刺激作用, 被认为是最古老的毒物之一。然而该化合物的药用价值最开始被张亨栋揭示出后, 科研人员才开始关注它。如今三氧化二砷已经被制成水剂, 通过静脉注射给急性早幼粒细胞白血病患者, 总缓解率达到 90%。且大量研究证实, 三氧化二砷可抑制肝癌细胞、食管癌细胞、宫颈癌 HeLa 和人口腔鳞状癌细胞的增殖, 对泌尿生殖系统和淋巴系统恶性肿瘤可能有一定抑制作用^[1-4]。为了探讨三氧化二砷是否在肾癌中发

挥抗癌的效果, 本研究选择了人肾癌细胞 786-O 作为研究模型, 从细胞水平初步探讨三氧化二砷对人肾癌细胞 786-O 增殖的影响, 并深入研究其相关信号转导途径, 现报道如下。

1 材料与方法

1.1 细胞培养 肾透明细胞癌细胞系 786-O 从中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库购买, 目录号 TCHu186。将购买的细胞接种于 RPMI-1640 培养基 (10% 胎牛血清和 50 μ g/mL 青霉素), 5% CO₂, 培养箱湿度为 90%, 37 $^{\circ}$ C 培养 3 d。每培养 3 d 传代 1 次, 取对数生长期的细胞进行实验。

1.2 实验分组和设计 将对数生长期的细胞分别接种于 96 孔板中, 并在 5% CO₂ 条件下培养。当 96 孔底部的 60% 面积贴满细胞后, 吸去培养基并更换新的 RPMI-1640 培养基。5%

CO₂, 37 °C 继续培养 24 h。最后将 90 孔细胞分成对照组和实验组, 每组 45 个孔。加入药物(0.5 μM 或 1.0 μM 三氧化二砷)和生理盐水之后分别于 0、12、24 h 取出 15 个孔细胞, 使用 BrdU 实验检测每孔细胞 DNA 合成量, 使用荧光定量聚合酶链反应(PCR)检测磷酸肌醇 3 激酶(PI3K)和蛋白激酶 B(Akt)相对 mRNA 表达量, 使用免疫印迹法(western blot)检测细胞内 PI3K 和 Akt 的相对表达量。

1.3 BrdU 掺入实验 参考文献[5]介绍的方法, 在收集待测孔细胞进行检测前 4 h 时向每个孔中加入一定量 BrdU 母液至 BrdU 终浓度为 100 mM, 5% CO₂ 37 °C 培养。培养结束后, 胰酶消化细胞, 用磷酸盐缓冲液(PBS)洗脱, 1 700 r/min 离心 5 min, 去上清液, 加入 10 mL 70% EtOH 重悬。用洗涤缓冲液(PBS + 0.5% IFS)洗涤。离心去上清液, 以 0.5 mL 2 M HCl + 0.5% IFS, 室温孵育 20 min。加入 1 mL 洗涤缓冲液洗涤细胞。离心去上清液, 以 0.1 M 的四硼酸钠(Na₂B₄O₇)重悬细胞, 室温孵育 2 min。用 1 mL 洗涤缓冲液洗涤细胞 2 次。用 50 μL 洗涤缓冲液重悬细胞, 加入 anti-BrdU 抗体, 4 °C 孵育 20 min。加入 1.5 mL 洗涤缓冲液洗 1 次。用 50 μL 洗涤缓冲液重悬细胞, 加入用于 FITC 结合 Fc 段的抗体, 4 °C 孵育 20 min。加入 1.5 mL 洗涤缓冲液洗涤 1 次。在 450 nm 的波长处读取吸光值, 用于定量每个孔内 DNA 合成量。

1.4 荧光定量聚合酶链反应(RT-PCR) 取出不同时间(0、12、24 h)对照组和观察组 3 个孔的细胞, 胰酶消化细胞, 用 PBS 洗脱, 1 700 r/min 离心 5 min, 去上清液, 收集细胞。使用 TRIzol Reagent 试剂盒抽提细胞的总 mRNA, 并用 DEPC 水定量至 5 μg/μL。使用 PrimeScript One Step RT-PCR Kit 将总 mRNA 拟转录成 cDNA, 并定量。特异性引物为 GAPDH-F: 5'-TGG TGA AGG TCG GTG TGA AC-3'; GAPDH-R: 5'-GCT CCT GGA AGA TGG TGA TGG-3'; PI3K-F: 5'-TTT CTC ATG GCT GTC CTT CAG-3', PI3K-R: 5'-CAG GAG AAT CTA ACG GAT GC-3'; Akt-F: 5'-CAT CAC ATC TGG TTT CCT TGG-3', Akt-R: 5'-AAC TGG AAA TGT AAT TTT GGG-3', 均为上海生工产品。以 GAPDH 为内参, 使用 SYBR Green RT-PCR 试剂盒和使用伯乐的 IQ5 PCR 系统扩增 cDNA 中的组织因子基因片段和 GAPDH 基因片段, 反应条件设置为: 95 °C 变性 5 min, 94 °C 变性 30 s, 57 °C 退火 1 min, 72 °C 延伸 30 s, 30 个循环, 72 °C 延伸 10 min。计算每个样品 TF 和 GAPDH 的 ΔCt, 并采用 ΔΔCt 法计算每个样品中 TF 的 mRNA 转录倍数^[6]。

1.5 免疫印迹 取出不同时间(0、12 h 和 24 h)对照组和观察组 3 个孔的细胞, 胰酶消化细胞, 用 PBS 洗脱, 400 × g 或 1 700 r/min 离心 5 min, 去上清液, 用缓冲液[50 mmol/L Tris-HCl, pH 7.4, 150 mmol/L NaCl, 1% Nonidet P-40, 0.5% 去氧胆酸, 0.1% 十二烷基磺酸钠(SDS), 5 mmol/L 乙二胺四乙酸(EDTA), 2 mmol/L 苯甲基磺酰氟(PMSF), 20 g/mL 抑肽酶, 20 g/mL 亮抑肽酶, 10 g/mL 胃蛋白酶抑制剂 A, 150 mmol/L 苯甲脒]重悬细胞至 5 × 10¹⁰ 个。抑肽酶破碎后 12 000 r/min 离心 20 min 后取上清液进行电泳。使用 5% 浓缩胶和 15% 分离胶进行电泳分离, 并使用电转将蛋白转至 PVDF 膜上。10% 牛奶封闭 PVDF 膜 1 h, 37 °C 孵育一抗 1 h, 然后 PBST 清洗 3 次, 每次 5 min, 然后用 37 °C 孵育二抗稀释液, 并用 PBST 清洗 3 次, 每次 5 min。最后用 ECL+plusTM 免疫印迹

系统试剂盒(Amersham, USA)配置显光液, 然后使用 3490 Photo 凝胶成像系统(Epson, Japan)拍照并记录, 并用 Image Pro PLUS 软件分析每个蛋白与 GAPDH 的相对量。

1.6 统计学处理 采用 SPSS19.0 软件进行统计学分析。所有连续资料均采用 *t* 检验, 结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示。所有离散资料均采用卡方检验, 统计结果以 χ^2 表示。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 三氧化二砷对人肾癌细胞 786-O 增殖的影响 使用 BrdU 掺入实验来检测 786-O 在三氧化二砷(观察组)和 PBS(对照组)刺激下 DNA 合成量, 用以评价三氧化二砷对人肾癌细胞 786-O 增殖的影响。从表 1 和图 1 可知, 0.5 μM 和 1 μM 三氧化二砷刺激 24 h 后, 观察组 DNA 合成量显著低于 0 h 时的 DNA 合成量, 差异有统计学意义($P < 0.05$), 从表 2 和图 2 可知, 0.5 μM 三氧化二砷刺激 24 h 后且均显著低于 0 h 和 12 h 的对照组 DNA 合成量, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。结果表明 0.5 μM 三氧化二砷刺激 24 h 有效地抑制人肾癌细胞 786-O 增殖。

表 1 不同浓度 As₂O₃ 对人肾癌细胞 786-O 增殖的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	0 μM	0.5 μM	1 μM
对照组	1.615 ± 0.275	2.713 ± 0.314	3.014 ± 0.252
观察组	1.543 ± 0.243	0.824 ± 0.273	0.513 ± 0.214

表 2 不同时间 As₂O₃ 对人肾癌细胞 786-O 增殖的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	0 h	12 h	24 h
对照组	1.235 ± 0.125	2.463 ± 0.214	3.952 ± 0.418
观察组	1.275 ± 0.243	0.946 ± 0.153	0.642 ± 0.114

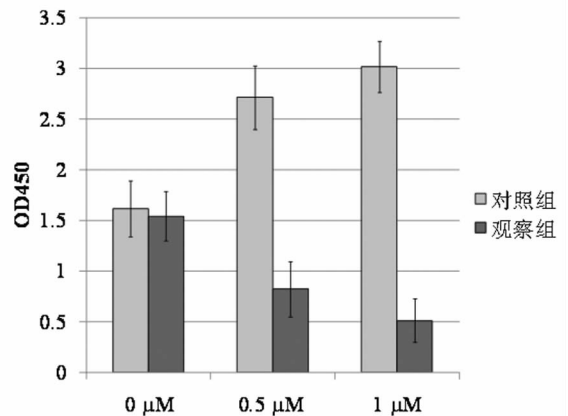


图 1 不同浓度 As₂O₃ 对人肾癌细胞 786-O 增殖的影响

2.2 三氧化二砷对人肾癌细胞 786-O 增殖中 PI3K 和 Akt mRNA 相对表达量的影响 使用 RT-PCR 来检测不同时间点(0、12 和 24 h)观察组和对照组细胞内 PI3K 和 Akt mRNA 相对的表达量(表 3、表 4 和图 3)。结果显示, 在 0、12 和 24 h 时观察组细胞内 PI3K 和 Akt mRNA 相对的表达量差异无统计学意义($P > 0.05$), 而对照组细胞内 PI3K 和 Akt mRNA 相对的表达量随着细胞增殖加快逐渐升高。说明 0.5 μM 三氧化

二砷有效地抑制人肾癌细胞 786-O 增殖内 PI3K 和 Akt 的转录水平。

地抑制人肾癌细胞 786-O 增殖内 PI3K 和 Akt 的蛋白的表达量。

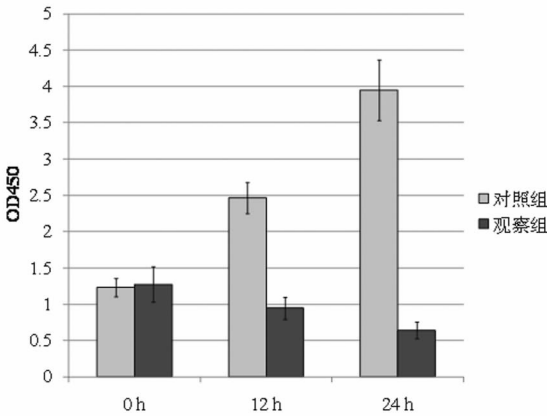


图 2 不同时间 As₂O₃ 对人肾癌细胞 786-O 增殖的影响

表 3 PI3K mRNA 的相对 GAPDH mRNA 的辉度结果

组别	0 h	12 h	24 h
对照组	0.613±0.193	0.812±0.126	1.214±0.112
观察组	0.658±0.184	0.614±0.112	0.719±0.091

表 4 Akt mRNA 的相对 GAPDH mRNA 的辉度结果

组别	0 h	12 h	24 h
对照组	0.913±0.092	1.742±0.096	2.061±0.092
观察组	0.958±0.083	1.127±0.082	1.375±0.114

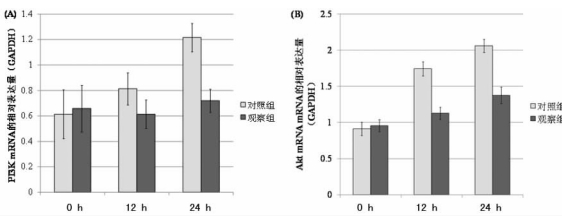


图 3 As₂O₃ 对人肾癌细胞 786-O 增殖中 PI3K 和 Akt 表达的影响

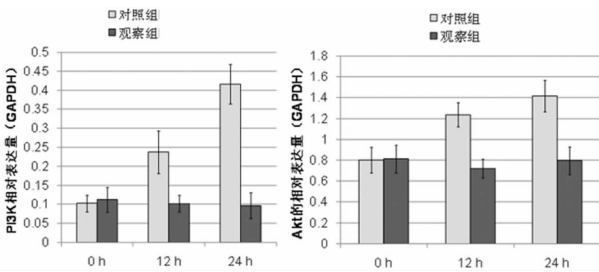


图 4 As₂O₃ 对人肾癌细胞 786-O 增殖中 PI3K 和 Akt 蛋白表达的影响

2.3 三氧化二砷对人肾癌细胞 786-O 增殖中 PI3K 和 Akt 蛋白表达的影响 使用免疫印迹法来检测不同时间点(0、12 和 24 h)观察组和对照组细胞内 PI3K 和 Akt 蛋白的表达量(表 5,表 6 和图 4)。在 0、12 和 24 h 时观察组细胞内 PI3K 和 Akt 蛋白的表达量差异无统计学意义($P>0.05$),而对对照组细胞内 PI3K 和 Akt mRNA 相对的表达量随着细胞增殖加快逐渐升高。说明 1 μ M 三氧化二砷有效地抑制人肾癌细胞 786-O 增殖内 PI3K 和 Akt 的转录水平。说明 0.5 μ M 三氧化二砷有效

表 5 PI3K 蛋白表达的辉度结果

组别	0 h	12 h	24 h
对照组 PI3K	0.102±0.022	0.237±0.056	0.416±0.052
观察组 PI3K	0.112±0.033	0.101±0.022	0.096±0.034

表 6 Akt 蛋白表达的辉度结果

组别	0 h	12 h	24 h
对照组	0.802±0.122	1.237±0.116	1.416±0.152
观察组	0.812±0.133	0.721±0.092	0.796±0.134

3 讨 论

大量研究均表明了三氧化二砷抑制肿瘤细胞增殖、促进细胞凋亡以及具有显著临床疗效。研究发现三氧化二砷可以抑制诱导宫颈癌细胞凋亡,并通过与 cytokeratin 18 结合以及下调 hTERT mRNA 的表达而发挥其作用^[7-8]。同样,三氧化二砷可抑制人淋巴细胞系 T2 的增殖,研究发现它可能通过调控 SHP-1 启动子以及 CpG 岛的功能,来干扰正常细胞或肿瘤细胞的增殖^[9]。另外三氧化二砷还可抑制肝癌细胞以及早幼粒白血病细胞的增殖,其中,研究最深入的是其在抑制早幼粒白血病细胞增殖、凋亡和死亡的研究^[10-11]。而且有很多报道发现了该分子在治疗白血病的临床疗效,例如张德芳等^[12]采用全反式视黄酸(ATRA)与三氧化二砷和化疗药物联合方案治疗初诊急性早幼粒细胞白血病,总有效率达到 96.9%,且无严重不良反应发生。另外,根据哈尔滨医学院的临床实践,瑞金医院血液科针对早幼粒白血病采用三氧化二砷治疗,并进行了一系列的研究,在国际上首先证实了三氧化二砷的应用可以特异诱导 APL 细胞凋亡。使得复发难治白血病得了突破,CR 率可达到 80%~90%,部分患者得以长期生存。从而开启了三氧化二砷用于白血病以及其他肿瘤的基础和临床研究。

虽然如此,但三氧化二砷作为一种剧毒分子,对泌尿系统具有严重的毒性作用,因此,有关三氧化二砷与肾癌的相关研究较少^[13]。目前已经清楚的是,0.5~2 μ M 的三氧化二砷可用于治疗早幼粒细胞白血病,且通过静脉注射注入人体后对机体其他器官和系统的损伤较小。因此,本研究选择研究不同剂量三氧化二砷作用不同时间对肾癌细胞的影响,以探讨在最低有效浓度下三氧化二砷治疗肾癌的潜在临床价值。结果表明 0.5 μ M 三氧化二砷刺激 24 h 可显著抑制了人肾癌细胞 786-O 增殖。为了进一步探讨 0.5 μ M 三氧化二砷抑制人肾癌细胞 786-O 增殖的作用机制,本研究选择研究该药物对 PI3K-Akt 细胞增殖信号转导途径的影响。PI3K-Akt 信号转导途径是调控肿瘤细胞增殖的主要信号途径,由于抑制基因 PTEN 的低表达从而诱导了 PI3K 的表达,进而促进了 Akt 分子的表达和磷酸化,从而开启了细胞内蛋白合成和 DNA 合成途径,以促进肿瘤细胞大量增殖。同样人肾癌细胞 786-O 的增殖同样受 PI3K-Akt 信号途径调控。本课题组研究发现 0.5 μ M 三氧化二砷在抑制人肾癌细胞 786-O 细胞增殖的同时,也抑制 PI3K 的 mRNA 和蛋白的表达,进而阻碍了 Akt 的表达。因此,可以得出,PI3K-Akt 信号途径参与了三氧化二砷抑制人肾癌细胞

增殖的过程,且更明确表明了三氧化二砷在治疗肾癌中的潜在临床价值。

另外,三氧化二砷虽然可通过抑制 PI3K-Akt 信号途径来发挥抑制人肾癌细胞增殖,但本研究仅在细胞水平进行了研究。有关三氧化二砷对肾癌的临床疗效,还需要通过动物实验进行进一步证实,并要比较不同浓度下三氧化二砷的效果以及对动物泌尿系统的毒性作用。

参考文献:

- [1] 苏镇军,郭莉莉,刘晓霞,等. 宝藜苷-I 联合三氧化二砷对食管癌 Eca-109 细胞增殖的影响[J]. 现代中西医结合杂志,2012,21(6):593-595.
 - [2] 吴文娟,邹英华,南月敏,等. 三氧化二砷碘油栓塞对兔 VX2 肝癌凋亡、增殖及肝功能的影响[J]. 实用放射学杂志,2006,22(1):1-4.
 - [3] 李红,邵海波,徐克. 经导管肝动脉三氧化二砷治疗兔 VX2 移植性肝肿瘤[J]. 中国医学影像技术,2009,25(5):878-880.
 - [4] 耿晓星,全丽娜,马荣,等. 三氧化二砷和全反式维甲酸对人宫颈癌 HeLa 细胞生长的影响[J]. 中华肿瘤杂志,2011,33(1):8-12.
 - [5] Xia H, Diebold D, Nho R, et al. Pathological integrin signaling enhances proliferation of primary lung fibroblasts from patients with idiopathic pulmonary fibrosis[J]. J Exp Med, 2008, 205(7):1659-1672.
 - [6] Meijerink J, Mandigers C, de Locht LV, et al. A novel method to compensate for different amplification efficiencies between patient DNA samples in quantitative real-time PCR[J]. J Mol Diagn, 2001, 3(2):55-61.
- (上接第 3144 页)
- [15] DiFedele LM, He J, Bonkowski EL, et al. Tumor necrosis factor alpha blockade restores growth hormone signaling in murine colitis [J]. Gastroenterology, 2005, 128(5):1278-1291.
 - [16] Greenhalgh CJ, Bertolino P, Asa SL, et al. Growth enhancement in suppressor of cytokine signaling 2 (SOCS-2)-deficient mice is dependent on signal transducer and activator of transcription 5b (STAT5b) [J]. Mol Endocrinol, 2002, 16(6):1394-1406.
 - [17] Schaefer F, Chen Y, Tsao T, et al. Impaired JAK-STAT signal transduction contributes to growth hormone resistance in chronic uremia [J]. J Clin Invest, 2001, 108(3):467-475.
 - [18] Sun D, Zheng Z, Tummala P, et al. Chronic uremia attenuates growth hormone induced signal transduction in skeletal muscle [J]. J Am Soc Nephrol, 2004, 15(10):2630-2636.

- [7] Yu J, Qian H, Li Y, et al. Therapeutic effect of arsenic trioxide (As₂O₃) on cervical cancer in vitro and in vivo through apoptosis induction [J]. Cancer Biol Ther, 2007, 6(4):580-586.
- [8] Zhou C, Boggess JF, Bae-Jump V, et al. Induction of apoptosis and inhibition of telomerase activity by arsenic trioxide As₂O₃ in endometrial carcinoma cells [J]. Gynecol Oncol, 2007, 105(1):218-222.
- [9] Yang L, Luo JM, Li Y, et al. As₂O₃ induces demethylation and up-regulates transcription of SHP-1 gene in human lymphoma cell line T2 cells [J]. Zhonghua Zhong Liu Za Zhi, 2009, 31(6):423-427.
- [10] Liu XM, Xiong XF, Song Y, et al. Possible roles of a tumor suppressor gene PIG11 in hepatocarcinogenesis and As₂O₃-induced apoptosis in liver cancer cells [J]. J Gastroenterol, 2009, 44(5):460-469.
- [11] Noh EK, Kim H, Park MJ, et al. Gefitinib enhances arsenic trioxide (As₂O₃)-induced differentiation of acute promyelocytic leukemia cell line [J]. Leuk Res, 2010, 34(11):1501-1505.
- [12] 张德芳,赵洪国. ATRA 与三氧化二砷合并化疗药物治疗急性早幼粒细胞白血病患者效果 [J]. 齐鲁医学杂志, 2010, 25(1):18-20, 23.
- [13] 王德林,米粲,陈在贤,等. 三氧化二砷抑制人肾癌 786-0 细胞血管生成及浸润转移机制的初步研究 [J]. 重庆医科大学学报, 2007, 32(2):134-137.

(收稿日期:2013-03-15 修回日期:2013-05-28)

- [19] Woelfle J, Rotwein P. In vivo regulation of growth hormone-stimulated gene transcription by STAT5b [J]. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2004, 286(3):393-401.
- [20] Karlsson H, Gustafsson JA, Mode A. Cis desensitizes GH induced Stat5 signaling in rat liver cells [J]. Mol Cell Endocrinol, 1999, 154(1/2):37-43.
- [21] Morales O, Faulds MH, Lindgren UJ, et al. 1alpha, 25-dihydroxyvitamin D3 inhibits GH-induced expression of SOCS-3 and CIS and prolongs growth hormone signaling via JAK2/STAT5 system in osteoblast like cells [J]. J Biol Chem, 2002, 277(38):34879-34884.
- [22] Tollet-Egnell P, Flores-Morales A, Stavréus-Evers A, et al. Growth hormone regulation of SOCS-2, SOCS-3, and CIS messenger ribonucleic acid expression in the rat [J]. Endocrinol, 1999, 140(8):3693-3704.

(收稿日期:2013-03-20 修回日期:2013-05-22)