

· 论 著 · doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2015.06.002

S-亚硝基谷胱甘肽对小鼠肠急性缺血再灌注损伤后肠屏障功能的影响*

彭科,许超,于敏,孙力华,肖卫东,杨桦[△]

(第三军医大学新桥医院普通外科,重庆 400037)

摘要:目的 探讨 S-亚硝基谷胱甘肽(GSNO)预处理对小鼠肠急性缺血再灌注(I/R)所致的肠黏膜屏障损伤的影响。方法 6~8 周龄雄性 C57BL/6 小鼠 24 只,分为 Sham 组、I/R 组、I/R+GSNO 组,每组 8 只。采用夹闭肠系膜上动脉 30 min,再灌注 6 h 作为小鼠肠 I/R 模型。苏木素-伊红(HE)染色观察小肠组织形态学的变化;免疫组织化学观察肠上皮细胞间紧密连接蛋白 claudin-1 的表达情况;Western blot 检测 claudin-1 蛋白水平变化。**结果** HE 染色显示,与 Sham 组比较,I/R 组肠黏膜明显肿胀,绒毛部分脱落、变粗,绒毛倒伏、断裂,而 I/R+GSNO 组肠黏膜无明显肿胀,绒毛完整,形态接近正常;免疫组织化学观察显示 I/R 刺激可造成肠上皮表面 claudin-1 连续性明显破坏,阳性表达率明显降低,I/R+GSNO 组肠上皮 claudin-1 连续性明显恢复,阳性染色显著增加;肠上皮 claudin-1 蛋白定量分析显示:与 Sham 组比较,I/R 组及 I/R+GSNO 小肠上皮紧密连接蛋白 claudin-1 表达分别下降 32.5%,13.8%($P<0.05$);与 I/R 组比较,I/R+GSNO 组小鼠肠上皮紧密连接蛋白 claudin-1 表达上调 27.8%($P<0.05$)。**结论** 小肠急性 I/R 刺激可造成明显的肠黏膜损伤及肠上皮间紧密连接的显著破坏;GSNO 预处理可通过上调 claudin-1 表达,有效缓解 I/R 对肠黏膜结构与肠上皮屏障功能的损伤。

关键词: S-亚硝基谷胱甘肽;肠黏膜屏障;紧密连接蛋白;肠缺血再灌注

中图分类号:R151

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2015)06-0724-03

The effect of S-Nitrosoglutathione on the intestinal epithelial barrier after acute ischemia reperfusion injury*

Peng Ke, Xu Chao, Yu Min, Sun Lihua, Xiao Weidong, Yang Hua[△]

(Department of General Surgery, the Affiliated Xinqiao Hospital of the Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract: **Objective** To investigate the effect of S-Nitrosoglutathione (GSNO) on acute ischemia reperfusion (I/R) induced intestinal barrier function lesion in a mouse model. **Methods** Twenty-four 6-8-year-old C57BL/6 mice were divided into 3 groups, 8 for each: (1) the sham group; (2) the I/R group; (3) the I/R+GSNO group. The mouse intestine I/R model was established by the occlusion of the superior mesenteric artery temporarily followed by reperfusion for 6 h. Histological changes in the small intestine were observed after HE staining; the expression of claudin-1 protein in the intestine epithelium was assessed by immunohistochemistry staining as well as western blot analysis. **Results** Both HE staining and immunohistochemistry results showed the integrate intestinal villi with the continuous Claudin-1 expression along the villi in the sham group; the intestinal villi of the I/R group partially detached, thickened, crooked and fractured, with the obvious disconnection of Claudin-1 staining along the top of the villi; while the intestinal villi of the I/R+GSNO group were neatly arranged and damage to intestinal mucosa was much alleviated, accompanied with the marked restoration of the continuity of claudin-1 staining. Compared to the sham group, claudin-1 protein level of for the I/R group and the I/R+GSNO group decreased by 32.5% and 13.8% respectively ($P<0.05$); and compared to the I/R group, claudin-1 protein level of the I/R+GSNO group increased by 27.8% ($P<0.05$). **Conclusion** Protein level of claudin-1 would decrease after I/R, and pretreatment with GSNO can effectively relieve the damage of intestinal mucosal structure as well as intestinal tight junction barrier through upregulating the expression of claudin-1 protein.

Key words: S-Nitrosoglutathione; intestinal epithelial barrier; tight junction protein; intestinal ischemia reperfusion

肠缺血再灌注(ischemia reperfusion, I/R)作为包括各种大型手术及急性创伤、战伤等多种急性病理刺激下临床常见的病理生理过程之一,是诱发肠道结构及功能损伤,继而导致肠黏膜屏障(intestinal epithelial barrier, IEB)功能破坏、肠道细菌移位及全身炎症反应综合征等系列连锁反应的重要原因,也是影响重症患者预后的重要因素^[1]。而 IEB 的结构及功能的完整性主要依赖于肠上皮间紧密连接蛋白的结构及功能的完整性^[2]。S-亚硝基谷胱甘肽(S-Nitrosoglutathione, GSNO)是一

种在亚硝基化环境下谷胱甘肽的衍生物^[3],已有研究发现其在肠道中也有表达,并在维持 IEB 结构与功能中有重要作用^[4]。还有研究表明 GSNO 能减轻多种炎性因子刺激对 IEB 的破坏作用^[5]。但目前在 GSNO 对肠 I/R 的防治未见有关报道,本实验通过建立小鼠肠 I/R 模型,探讨 GSNO 对于肠 I/R 的防治作用。

1 材料与方法

1.1 实验动物、主要仪器及试剂 雄性 C57BL/6 小鼠 24 只

* 基金项目:国家自然科学基金重点项目(NSFC 81330013);国家自然科学基金面上项目(NSFC 81272078, NSFC 81270451 to W. D. X.); 国家教育部创新团队项目基金(教技函[2013]59号)。作者简介:彭科(1987-),住院医师,硕士,主要从事胃肠疾病研究。△ 通讯作者, E-mail: hwbayang@126.com。

购自重庆第三军医大学实验动物中心,6~8 周龄,体质量 20~25 g。蛋白酶抑制剂(PMSF)、苏木素、二甲苯、聚偏二氟乙烯(PVDF)膜购自美国 Millipore 公司。GSNO 购自美国 Sigma 公司。claudin-1 一抗购自 Abcam 公司,辣根过氧化物酶(HRP)标记二抗、化学发光(ECL)检测试剂盒、RIPA 裂解液、蛋白测定试剂盒和十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)凝胶配置试剂盒均购自武汉博士德生物工程公司。垂直电泳仪、湿转电转仪购自美国 Bio-Rad 公司。

1.2 肠 I/R 模型制备及分组处理方法 24 只小鼠分为 3 组($n=8$)。假手术组(sham 组)、I/R 组、GSNO 干预组(I/R+GSNO 组)。术前 12 h 禁食,自由饮水。其中 I/R+GSNO 组术前 30 min 和术后经腹腔注射 GSNO 溶液 10 mg/kg^[4];同时 I/R 组、sham 组给予等量的生理盐水。小鼠腹腔注射 0.15 mL 0.1% 的戊巴比妥钠麻醉后切开腹部,沿其腹正中中线切开,寻找并游离肠系膜上动脉(superior mesenteric artery, SMA)根部。其中 I/R 组及 I/R+GSNO 组,用动脉夹夹闭 SMA 根部 30 min 后松开动脉夹恢复血流,sham 组只游离 SMA 不行夹闭。待 6 h 后将各组小鼠处死,取其小肠组织。

1.3 小肠组织形态学的观察 距小鼠回盲部 10 cm 以上取小肠组织,经甲醛固定,常规脱水、石蜡包埋、切片后 HE 染色。光镜下观察肠黏膜组织形态学变化。

1.4 肠 claudin-1 免疫组织化学染色 石蜡切片脱蜡,用 pH7.4 的 PBS 冲洗 3 次,柠檬酸缓冲液微波抗原修复的后阻断内源性过氧化物酶的活性。一抗室温下孵育 2 h。DAB 液显色,苏木素复染,自来水冲洗、蓝化,中性树脂胶封固,晾干后观察。

1.5 小肠组织蛋白提取及 Western blot 检测 肠黏膜在混有

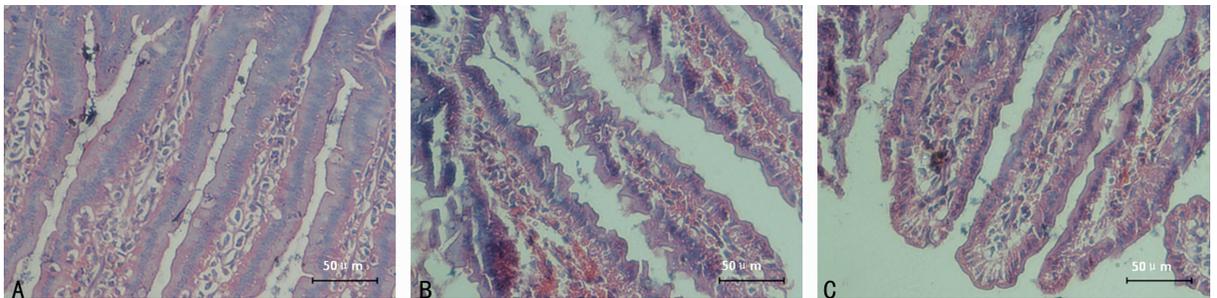
1 mmol/L 的苯甲基磺酰氟(PMSF)的 RIPA 裂解液中采用超声裂解法裂解组织细胞,冰浴 30 min,12 000 r/min 4 ℃ 离心 15 min。用蛋白测定试剂盒测定上清液蛋白含量。蛋白上样后 80 V 电泳 2 h,100 V 恒压湿转 1 h 至 PVDF 膜,转膜结束后用 50 g/L 的脱脂奶粉封闭 1 h。分别加入一抗 claudin-1 抗体(1:500)、甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH,1:1 000),4 ℃ 冰箱 12 h。TBST 洗膜 3 次,每次 10 min。然后加入二抗后室温孵育 1 h。TBST 洗膜 3 次,每次 10 min。加入 ECL 化学发光试剂显影,采用图像分析系统采集发光信号,经 Kodak Molecular Imaging 软件行密度分析,以目的蛋白与 GAPDH 灰度比值作为目的蛋白相对表达量。

1.6 统计学处理 采用 SPSS13.0 统计软件,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用单因素方差分析进行组间比较,检验水准 $\alpha=0.05$,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

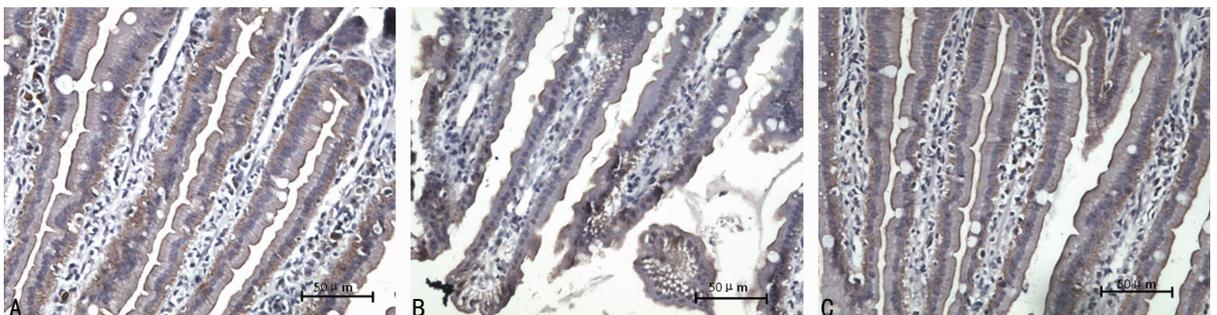
2.1 小肠组织形态学的改变 小肠 HE 染色显示 sham 组肠绒毛排列整齐,形态结构完整;IR 组肠绒毛排列紊乱,可见明显肿胀、变粗,肠黏膜坏死,组织结构松散;I/R+GSNO 组肠黏膜部分坏死,肠绒毛未见明显水肿,显著改善了肠 I/R 所致的肠黏膜形态结构的破坏,见图 1。

2.2 紧密连接蛋白 claudin-1 在肠黏膜中的表达变化 免疫组织化学显示 3 组小肠黏膜 claudin-1 均沿肠上皮细胞膜表面分布,为棕黄色线性染色,细胞核及细胞核膜无表达。sham 组线性结构完整,表达均匀,I/R 组阳性结果明显减弱,细胞膜表面阳性结果呈迷离性表达,其连续性断裂。I/R+GSNO 组较 I/R 组有明显改善。见图 2。



A: sham 组; B: I/R 组; C: I/R+GSNO 组。

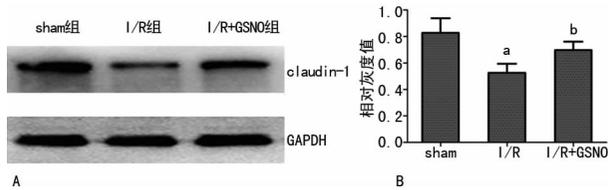
图 1 小肠切片 HE 染色结果(×400)



A: sham 组小肠 claudin-1 结构完整,表达连续; B: I/R 组小肠 claudin-1 表达严重丢失,其连续性完全断裂; C: I/R+GSNO 组小肠 claudin-1 表达部分丢失,连续性部分断裂。

图 2 紧密连接蛋白 claudin-1 在肠黏膜中的表达变化

2.3 半定量分析肠上皮细胞 claudin-1 的变化 建立小鼠 I/R 模型后,提取肠上皮总蛋白,通过 Western blot 检测小肠上皮中 claudin-1 蛋白水平的表达变化。结果显示,与 sham 组比较,I/R 组及 I/R+GSNO 组小肠上皮紧密连接蛋白 claudin-1 表达分别下降 32.5%,13.8% ($P < 0.05$);其中,与 I/R 组比较,I/R+GSNO 组小鼠肠上皮紧密连接蛋白 claudin-1 表达上调 27.8% ($P < 0.05$)。提示 I/R 刺激可造成肠上皮紧密连接蛋白 claudin-1 表达的显著下降,而 GSNO 预处理可明显抑制 I/R 对 claudin-1 表达的下调作用。见图 3。



A: Western blot 图; B: Western blot 分析图; ^a: $P < 0.05$, 与 sham 比较; ^b: $P < 0.05$, 与 I/R 组比较。

图 3 小鼠缺血再灌注模型及 GSNO 预处理对 claudin-1 蛋白表达的影响

3 讨论

IEB 在维持肠黏膜完整性及机体内环境稳态方面发挥着关键作用^[6]。其中机械屏障是其重要的屏障之一。而机械屏障的结构基础是完整的肠上皮细胞(IEC)和相邻上皮细胞之间的紧密连接蛋白(TJ)。紧密连接的基本组成单位是跨膜的连接蛋白,主要有 claudin 蛋白,闭锁蛋白(occludin)、zona occludens(ZO)以及连接黏附分子(JAM)等。上皮间的细胞通过以上蛋白进行连接,封闭细胞间隙,从而有效的维持内环境的稳态^[2]。许多病理情况如严重感染、休克、大面积烧伤、严重创伤等均可导致肠屏障功能的破坏,造成肠源性感染,进一步加重原发疾病,甚至诱发全身炎症反应综合征,导致多脏器功能衰竭^[6]。

GSNO 是最重要的 S-亚硝基硫醇之一,通常被认为是一氧化氮(NO)在体内的供体以及细胞间亚硝基化中间的代谢产物^[3]。主要的代谢合成机制是 NO 在机体内可与还原型谷胱甘肽(glutathione,GSH)形成亚硝基化合物 GSNO^[7]。目前有研究表明 GSNO 在心脏缺血及心肌梗死方面对心肌有良好的保护作用^[8]。Lima 等^[9]研究认为在中枢神经系统中,给予 GSNO 预处理,可以减轻脑缺血再灌注模型对血脑屏障的损伤,且可能与其代谢的关键酶亚硝基谷胱甘肽还原酶(S-nitrosoglutathione reductase,GSNOR)有关^[10]。大量研究证实胃在胃肠道方面,GSNO 能缓解多种炎症因子刺激下肠黏膜屏障的破坏,Flamant 等^[11]发现 GSNO 减少了弗氏志贺菌(*Shigella flexneri*)对 Caco-2 细胞的感染,从而提高了 Claudin 在志贺菌感染模型下的表达。然而 GSNO 在 I/R 模型中是否对肠黏膜屏障仍具有保护作用目前尚不清楚。

通过本研究的结果可得出:GSNO 可以明显的减轻小鼠在肠 I/R 模型中对肠屏障的损伤作用。主要作用可能是通过调节 claudin-1 实现的。肠道血供丰富,是 I/R 损伤最易受累的器官之一^[12]。肠缺血可造成明显的组织损伤,而再灌注后肠组织在原缺血造成损伤的基础上组织损伤将进一步加重,则形成再灌注损伤^[13]。有研究认为 GSNO 在病理条件下对肠黏膜屏障的保护作用的主要原因可能是抑制了再灌注后大量氧自由基、炎性细胞因子的释放、P38MAPK 信号通路的激活。同

时 GSNO 作为 NO 信号通路的组成部分,松弛胃肠道平滑肌及血管,有效地缓解了小鼠肠 I/R 损伤作用^[14-16]。目前已发现通过激动与抑制 GSNO 的合成均能影响其对 IEB 功能的作用^[4]。综上所述,GSNO 在肠 I/R 模型下能有效的缓解小鼠 IEB 功能的破坏,但具体机制还需进一步探讨。本研究结果可为未来 GSNO 治疗和预防肠 I/R 损伤提供可靠的实验依据。

参考文献:

- [1] Vollmar B, Menger MD. Intestinal ischemia/reperfusion: microcirculatory pathology and functional consequences [J]. *Langenbecks Arch Surg*, 2011, 396(1): 13-29.
- [2] 高志光, 秦环龙. 肠上皮细胞紧密连接的生物学功能及在肠屏障中的作用[J]. *肠外与肠内营养*, 2005, 12(5): 299-302.
- [3] Broniowska KA, Diers AR, Hogg N. S-nitrosoglutathione [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2013, 1830(5): 3173.
- [4] Savidge TC, Newman P, Pothoulakis, et al. Enteric glia regulate intestinal barrier function and inflammation via release of S-nitrosoglutathione [J]. *Gastroenterology*, 2007, 132(4): 1344-1358.
- [5] Cheadle GA, Costantini TW, Lopez N, et al. Enteric glia cells attenuate cytomix-induced intestinal epithelial barrier breakdown[J]. *PLoS One*, 2013, 8(7): e69042.
- [6] 黎介寿. 肠衰竭——概念、营养支持与肠黏膜屏障维护 [J]. *中国临床营养杂志*, 2004, 12(3): 155-158.
- [7] Sarr M, Chataigneau M, Etienne-Selloum N, et al. Targeted and persistent effects of NO mediated by S-nitrosation of tissue thiols in arteries with endothelial dysfunction [J]. *Nitric Oxide*, 2007, 17(1): 1-9.
- [8] Lima B, Lam GK, Xie L, et al. Endogenous S-nitrosothiols protect against myocardial injury[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009, 106(15): 6297-6302.
- [9] Lima B, Lam GK, Xie L, et al. Neuroprotection of S-nitrosoglutathione against ischemic injury by down-regulating Fas S-nitrosylation and downstream signaling [J]. *Neuroscience*, 2013, 248: 290-298.
- [10] Palmer LA, deRonde K, Brown-Steinke K, et al. hypoxia-induced changes in protein s-nitrosylation in female mouse brainstem[J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2015, 52(1): 37-45.
- [11] Flamant M, Aubert P, Rolli-Derkinderen M, et al. Enteric glia protect against *Shigella flexneri* invasion in intestinal epithelial cells: a role for S-nitrosoglutathione [J]. *Gut*, 2011, 60(4): 473-484.
- [12] Flessas II, Papalois AE, Toutouzas K, et al. Effects of lazarooids on intestinal ischemia and reperfusion injury in experimental models[J]. *J Surg Res*, 2011, 166(2): 265-274.
- [13] Xiao W, Wang W, Chen W, et al. GDNF is involved in the barrier-inducing effect of enteric glial cells on intestinal epithelial cells under acute ischemia reperfusion stimulation[J]. *Mol Neurobiol*, 2014, 50(2): 274-289.
- [14] Beutheu S, Ghouzali I, Galas L, et al. Gluta-(下转第 729 页)

物的形式与单核巨噬细胞膜上的 Toll 样受体 4(TLR4)结合导致 TLR4 的聚合而活化。LPS 还可激活丝裂原激活的蛋白激酶(MAPK) 通路,二者均可导致炎症细胞因子的大量表达^[8]。本研究证实,通过皮下注射小剂量 LPS 8 周后,与对照组比较,造模组血清中炎症细胞因子 TNF- α 、IL-1、IL-6、MCP-1 的表达显著增加,差异有统计学意义($P < 0.05$)。

本研究通过单一皮下注射小剂量 LPS 诱导产生慢性炎症的方法研究长期、低度炎症刺激对大鼠血糖的影响,结果如图 2 所示,与 Cani 等^[9]的研究一致,模型组大鼠的血糖显著高于对照组,达到 T2DM 大鼠的成模标准。目前有关炎症因子引起胰岛素抵抗的途径及机制已较为清楚,主要通过作用于胰岛素信号传导通路,抑制胰岛素信号转导来调节胰岛素^[10-11]。如 TNF- α 、MCP-1 水平的上升能促进胰岛素受体底物 1(IRS-1)的丝氨酸磷酸化。IRS-1 是胰岛素信号转导通路中的重要信号蛋白,丝氨酸/酪氨酸磷酸化是信号转导的主要环节。IRS-1 的丝氨酸磷酸化减弱胰岛素信号转导的同时干扰正常酪氨酸的磷酸化,从而导致 IRS-1 对胰岛素敏感性下降,产生胰岛素抵抗。胰岛素抵抗发生是 T2DM 的发病基础。但 Cani 等^[9]的研究表明血清胰岛素与对照组差异无统计学意义($P > 0.05$),而本研究发现模型组大鼠与对照组比较空腹胰岛素显著升高,差异有统计学意义($P < 0.05$)。其原因可能是 Cani 等^[9]研究中持续注射 LPS 4 周,而本研究持续注射了 8 周。表明通过持续皮下注射 LPS,长期的低度炎症刺激可诱导大鼠出现胰岛素抵抗并引起糖代谢异常。与此同时,与 Dandona 等^[12]通过高脂饮食诱导胰岛素抵抗及 T2DM 的结果一致,第 5 周开始模型组大鼠体质量增长较对照明显,差异有统计学意义($P < 0.05$)。说明经过 LPS 刺激产生慢性低度炎症干扰了机体正常的能量代谢,进而产生肥胖、胰岛素抵抗。通过 OGTT 实验发现:8 周末造模组各时间点血糖均高于对照组,在 120 min 血糖水平仍然较高,达到 T2DM 造模标准。同时检测胰岛素水平发现造模组高峰后延至 120 min。与以往研究中发现的 T2DM 胰岛素分泌往往存在早期相受损,晚期相延迟这个理论相符。从而进一步说明该模型符合 T2DM 的特点。

本研究采用持续皮下注射小剂量 LPS 成功地建立了大鼠 T2DM 模型,模拟临床慢性低度炎症和胰岛素抵抗引发糖尿病的发生、发展过程,为进一步阐明慢性炎症和胰岛素抵抗与 T2DM 等代谢性疾病关系的分子机制提供了一定的帮助。采用本方法建立动物模型,无一只大鼠死亡,成功率高,方法比较简单,对其他器官组织影响小。可作为针对慢性低度炎症导致胰岛素抵抗、T2DM 的信号通路中的关键环节进行靶向药物的研发,当然,这只是小样本的实验,要想得到更为肯定的结果,还需要进一步扩大样本量来证实。

参考文献:

[1] Krispel C, Rodrigues M, Xin XB, et al. Ranibizumab in di-

abetic macular edema[J]. World J Diabetes, 2013, 4(6): 310-318.

[2] Cani PD, Neyrinck AM, Fava F, et al. Selective increases of bifidobacteria in gut microflora improve high-fat-diet-induced diabetes in mice through a mechanism associated with endotoxaemia[J]. Diabetologia, 2007, 50(11): 2374-2383.

[3] Cani PD, Bibiloni R, Knauf C, et al. Changes in gut microbiota control metabolic endotoxemia-induced inflammation in high-fat diet-induced obesity and diabetes in mice[J]. Diabetes, 2008, 57(6): 1470-1481.

[4] Gordon JI, Backhed F, Ding H, et al. The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2004, 101: 15718-15723.

[5] Jumpertz R, Le DS, Turnbaugh PJ, et al. Energy-balance studies reveal associations between gut microbes, caloric load, and nutrient absorption in humans [J]. Am J Clin Nutr, 2011, 94(1): 58-65.

[6] Liu CJ, Cheng YC, Lee KW, et al. Lipopolysaccharide induces cellular hypertrophy through calcineurin/NFAT-3 signaling pathway in H9c2 myocardial cells[J]. Mol Cell Biochem, 2008, 313(1/2): 167-178.

[7] Ohta H, Wada H, Niwa T, et al. Disruption of tumor necrosis factor α gene diminishes the development of atherosclerosis in ApoE-deficient mice[J]. Atherosclerosis, 2005, 180(1): 10-11.

[8] McAleer JP, Vella AT. Understanding how lipopolysaccharide impacts CD4 T-cell immunity[J]. Crit Rev Immunol, 2008, 28(4): 281-299.

[9] Cani PD, Amar J, Iglesias MA, et al. Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance [J]. Diabetes, 2007, 56(7): 1761.

[10] Osto M, Zini E, Franchini M, et al. Subacute endotoxemia induce adipose inflammation and changes in lipid and lipoprotein metabolism in cats [J]. Endocrinology, 2011, 152(3): 804-815.

[11] Cai D, Yuan M, Frantz DF, et al. Local and systemic insulin resistance resulting from hepatic activation of IKK- β and NF- κ B [J]. Nat Med, 2005, 11(2): 183-190.

[12] Dandona P, Aljada A, Bandyopadhyay A, et al. Inflammation; the link between insulin resistance, obesity and diabetes[J]. Trends Immunol, 2004, 25(1): 4-7.

(收稿日期:2014-08-15 修回日期:2014-11-15)

(上接第 726 页)

mine and arginine improve permeability and tight junction protein expression in methotrexate-treated Caco-2 cells [J]. Clin Nutr, 2013, 32(5): 863-869.

[15] Kiroglu OE, Aydinoglu F, Ogulener N. The effects of thiol modulators on nitrergic nerve- and S-nitrosothiols-induced relaxation in duodenum [J]. J Basic Clin Physiol

Pharmacol, 2013, 24(2): 143-150.

[16] Corti A, Franzini M, Scatagliani I, et al. Mechanisms and targets of the modulatory action of S-nitrosoglutathione (GSNO) on inflammatory cytokines expression [J]. Arch Biochem Biophys, 2014, 562: 80-91.

(收稿日期:2014-09-15 修回日期:2014-11-28)