

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2017.35.005

含精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸环两亲性肽自组装凝胶与骨髓间充质干细胞相容性研究*

肖仁顺,阮宏,蒋星海,吴凯,王晓梅,宋玉林[△]
(南昌大学第二附属医院骨科,南昌 330006)

[摘要] **目的** 分析骨髓间充质干细胞(BMSCs)与两亲性肽三维凝胶的相容性。**方法** 取3周龄SD健康大鼠3只,分离股骨、胫骨获取BMSCs,采用流式细胞术检测BMSCs表面抗原;将10 mg/mL含精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸(RGD)环两亲性肽溶液加入等体积DMEM/F12培养基数秒后自组装成三维凝胶,透射电镜显微镜(TEM)下观察三维凝胶结构;1×10⁶ cells/mL BMSCs悬液与RGD环两亲性肽混合形成三维培养体系,1×10⁶ cells/mL BMSCs悬液与多聚赖氨酸混合形成二维培养体系,无血清培养;CCK-8法观察细胞生长情况,钙黄绿素乙酰氧基甲酯/碘化丙啶(PI)双标染色,荧光显微镜观察RGD环两亲性肽对BMSCs增殖的影响。**结果** 分离培养的细胞高表达CD29、CD90,不表达或低表达CD34、CD45;TEM显示凝胶由多空纳米纤维构成,纳米纤维直径2~5 nm,长度100~1 000 nm;质谱测得合成多肽相对分子质量为1 256.37,与理论值一致;高效液相色谱分析两性亲肽纯度为95.88%;钙黄绿素乙酰氧基甲酯/PI双标染色显示,三维培养体系中,30 min后少数BMSCs出现死亡,12 h后细胞开始增殖,增殖较二维培养活跃,差异有统计学意义($P<0.05$);CCK-8细胞计数显示,三维培养体系细胞增殖活力高于二维培养体系,差异有统计学意义($P<0.05$)。**结论** RGD两性亲肽与BMSCs有良好的生物相容性,可能成为组织工程支架材料。

[关键词] 精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸;间质干细胞;两亲性肽;细胞相容性

[中图分类号] R318

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2017)35-4912-05

Study on compatibility of self-assembled gel containing RGD amphiphilic peptide with bone marrow mesenchymal stem cells*

Xiao Renshun, Ruan Hong, Jiang Xinghai, Wu Kai, Wang Xiaomei, Song Yulin[△]

(Department of Orthopedics, the Second Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang, Jiangxi 330006, China)

[Abstract] **Objective** To analyze the compatibility of bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs) with amphiphilic peptide three-dimensional gel. **Methods** Three healthy 3-week-old SD rats were taken for separating femur and tibia to obtain BMSCs, the BMSCs surface antigen was detected by flow cytometry; the 10 mg/mL RGD-cyclic amphiphilic peptide solution was added into the same volume of DMEM/F12 culture medium, after a few seconds, which was self assemble into three-dimensional gel. Three dimensional gel structure was observed by transmission electron microscope (TEM). 1×10⁶ cells/mL BMSCs suspension and RGD-cyclic amphiphilic peptide were mixed to form a 3D culture system, 1×10⁶ cells/mL BMSCs suspension was mixed with polylysine to form a 2D culture system, the serum-free culture was conducted; the CCK-8 method was used to observe the cell growth situation, calcein acetoxy methyl ester/propidium iodide (PI) double standard staining was performed. The effect of RGD-cyclic amphiphilic peptide on the proliferation of BMSCs was observed by fluorescence microscopy. **Results** The separated and cultured BMSCs highly expressed CD29 and CD90, but lowly expressed or did not express CD34 and CD45; TEM showed that the gel was composed of multiple empty nanofibers with the nanofiber diameter of 2–5 nm and length of 100–1 000 nm; the molecular weight of synthetic peptides detected by mass spectrometry (MS) was 1 256.37, which was consistent with the theoretical value; the HPLC analysis showed that RGD-amphiphilic peptide purity was 95.88%; the calcein acetoxy methyl ester/PI double staining showed that in the 3D culture system, a few BMSCs died after 30 min and the cells began to proliferate after 12 h, the proliferation was more active than that of 2D culture, and the difference was statistically significant ($P<0.05$); CCK-8 cell count showed that the proliferation activity of 3D culture system was higher than that of 2D culture system, and the difference was statistically significant ($P<0.05$). **Conclusion** RGD amphiphilic peptide has a good biocompatibility with BMSCs, and may become the tissue engineering scaffold material.

[Key words] Arg-Gly-Asp; mesenchymal stem cells; amphiphilic peptide; cytocompatibility

材料的生物相容性和细胞亲和性可以通过固定的某些生物活性分子在聚合物或生物材料表面改进,为种子细胞黏附、增殖、扩展和分化提供良好的界面,促进细胞外基质的生产,是构建组织工程产品的重要措施。组织工程的快速发展,给神经组织修复和再生带来新的希望。组织工程的三要素为支架材

料、种子细胞和细胞因子,其中神经支架材料用以恢复神经的三维结构,利于细胞的黏附、生长、分化、增殖,并提供足够大的表面积和容积,从而达到对神经细胞的支持、营养作用,最终有利于血管的生成。支架最佳生长模型具有很高的生物相容性和生物降解性,易于细胞附着、生长,以及及时地摄入营养和排

* 基金项目:国家自然科学基金资助项目(81360271,30801158);江西省教育厅课题(GJJ14054);江西省自然科学基金计划项目(20151BAB205051);南昌大学研究生创新专项基金(CX2016326)。作者简介:肖仁顺(1991—),住院医师,硕士,主要从事脊髓损伤、两性肽组织模块方面的研究。△ 通信作者,E-mail:songyulin2001@163.com。

出废物^[1]。自组装肽纳米纤维支架高度模拟细胞外基质并支撑细胞生长,同时具有良好的生物相容性,已成为神经组织工程材料的首要选择^[2]。骨髓间充质干细胞(bone mesenchymal stem cells, BMSCs)具有多向分化的潜能、低免疫原性等优点,成为神经组织工程理想的种子细胞^[3]。本实验通过设计与合成精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸(Arg-Gly-Asp, RGD)环两性亲肽,自组装形成多孔三维两性亲肽凝胶支架,研究 SD 大鼠 BMSCs 与含 RGD 环两性亲肽的相容性。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 健康 3 周龄 SD 大鼠 3 只,由南昌大学医学院动物中心提供。

1.1.2 主要仪器与试剂 RGD 环两性亲肽结构分子式为 C16H31O₃G4D2RGD,委托上海波肽公司合成,用高效液相色谱仪和质谱仪进行纯化和分析,相对分子质量为 1 256.37,纯度为 95.88%。DMEM/F12 培养基(美国 Gibco 公司),碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)、表皮生长因子(EGF)、B27(美国 Gibco-BRL 公司),碘化丙啶(PI),钙黄绿素乙酰氧基甲酯(美国 Invitrogen 公司),CCK-8 细胞计数试剂盒(日本 DOJINDO 公司)。0.1 mol/L 氢氧化钠(NaOH)、0.1 mol/L 盐酸(HCl,国药集团化学试剂有限公司),兔抗大鼠 CD29、CD45、CD90 多克隆抗体(英国 Abcam 公司)。倒置相差显微镜、荧光倒置显微镜(日本 Olympus 公司),JEM-1230 型透射电子显微镜(日本 JEOL 公司),流式细胞仪(美国 BD 公司),细胞培养孵培养箱、多功能酶标仪(美国 Thermo 公司)。

1.2 方法

1.2.1 BMSCs 分离获取 腹腔注射麻醉后脊髓脱臼处死大鼠,放入 75%乙醇浸泡 30 min,无菌环境下去除股骨、胫骨上的肌肉组织,取出股骨及胫骨,用磷酸盐缓冲液(PBS)冲洗 2 次,剪刀剪去股骨及胫骨两端骨髓,用 5 mL 注射器吸入含 20 μg/L bFGF、20 μg/L EGF、2% B27 的无血清 DMEM/F12 培养基冲洗骨髓腔,直到骨髓腔变白,将冲洗液移入 25 cm² 细胞培养瓶中,置于 37 °C、5% 二氧化碳(CO₂)细胞培养箱中培养。48 h 后仅将瓶子中培养液倒出更换新鲜培养液,不用 PBS 清洗瓶底。之后每隔 2 天更换新鲜培养液,待细胞铺满培养瓶底 90% 以上,加入胰蛋白酶消化,传代培养,细胞第 3 代进行细胞流式分析。

1.2.2 BMSCs 表面抗原流式鉴定 取培养至第 3 代的 BMSCs,用 0.25% 胰蛋白酶消化后加入等体积含胎牛血清培养基终止消化,1 000 r/min 离心 5 min 后去除培养基。加入少量 PBS 后用移液管均匀吹打,将细胞水平调整至 1×10⁶ cells/L。取 1 mL 1×10⁶ cells/L 细胞悬液分别移入 4 支流式管中,PBS 清洗细胞悬浮液 2 遍,再加入缓冲液重悬。每管分别加入藻红

蛋白(PE)标记的单克隆抗体 5 μL,同型非特异性 IgG-PE 为阴性对照,避光室温反应 30 min。流式细胞仪上检测。

1.2.3 RGD 环两性亲肽自组制备 取 10 mg RGD 环两性亲肽放入 2 mL 小管,加入 0.1 mol/L NaOH 溶液 400 μL 充分振荡混匀溶解,加入 400 μL 无菌双蒸水,再以每次滴加 0.1 mol/L HCl 10 μL 的方式缓慢调节多肽溶液至 pH 8,继续滴入无菌双蒸水至体积为 1 mL,此时多肽浓度为 10 mg/mL,多肽溶液呈黏稠状态。取 200 μL 黏稠状多肽溶液滴入等体积含钙离子(Ca²⁺)等二价阳离子酚红的 DMEM/F12 自组装成凝胶。取 10 μL 两性亲肽凝胶滴入金属网格中,脱水,晾干,磷钨酸染色,进行透射电镜显微镜(TEM)观察。

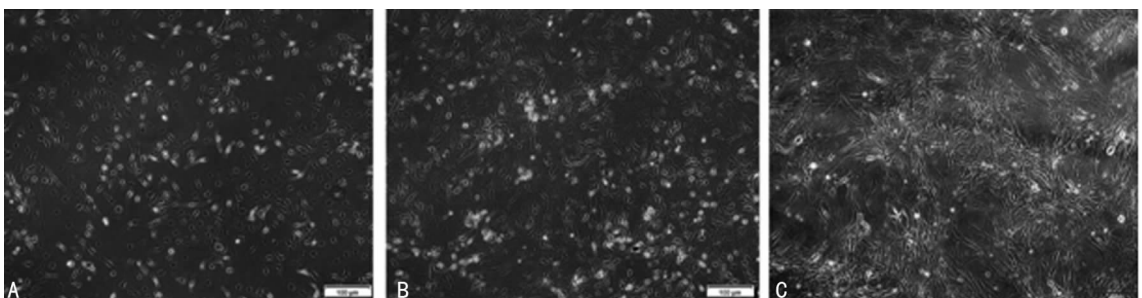
1.2.4 RGD 环两性亲肽凝胶与 BMSCs 的复合性培养 将盖玻片放入 24 孔板内,取 10 mg/mL RGD 两性亲肽溶液 200 μL 滴加到盖玻片,包被盖玻片,将培养至第 3 代密度为 1×10⁶ cells/mL 的 BMSCs 等体积接种于 RGD 环两性亲肽包被的盖玻片上,数秒后形成三维凝胶细胞体系;凝胶内部 pH 值为 7.35,将凝胶细胞培养体系置于 37 °C 5% CO₂ 孵箱中无血清培养,取 200 μL 密度为 1×10⁶ cells/mL 的 BMSCs 悬液滴在多聚赖氨酸包被的盖玻片上,37 °C 5% CO₂ 孵箱中无血清培养(二维培养体系)。培养 6、12、24 h 的盖玻片以 PBS 清洗 3 次,在盖玻片上滴入配好的终浓度为 2 μmol/L 的钙黄绿素乙酰氧基甲酯,终浓度为 4 μmol/L 的 PI,37 °C 孵育 15 min,荧光显微镜下观察黄绿色的活细胞,红色的死细胞。

1.2.5 RGD 环肽对 BMSCs 增殖/毒性的作用 取 96 孔板,将 1×10⁵ cells/mL BMSCs 悬液 100 μL 接种于 96 孔板中,10 mg/mL 环肽溶液 100 μL 加入 40 孔(三维细胞培养体系),每组 8 孔;10 mg/mL 环肽溶液 100 μL 加入余下的 40 孔(二维细胞培养体系),每组 8 孔,每天分别向三维细胞培养体系 1 组 8 孔和二维细胞培养体系 1 组 8 孔中加入 10 μL CCK-8 试剂,避光置于 37 °C、5% CO₂ 孵箱 2 h,调整到 460 nm 上机测量吸光度值(A 值),连续测量 5 d。计算每天每组 A 值的平均数,以时间为横轴,A 值为纵轴绘制 BMSCs 的生长曲线。

1.3 统计学处理 采用 SPSS19.0 统计软件进行统计分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,三维体系与二维体系比较采用配对样本 *t* 检验,以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 倒置显微镜观察原代 BMSCs 形态及生长情况 冲洗骨髓腔出来的细胞,在第 2、3 天 BMSCs 开始贴壁,细胞两端成梭形,细胞核成卵圆形,细胞生长呈克隆式,细胞呈大小不一放射状的集落,开始生长较慢,2 周左右细胞铺满培养瓶 90% 以上,细胞呈漩涡式、鱼状排列,胰酶消化后细胞贴壁均匀生长,形态为长梭形,传代后 3 d 左右细胞铺满培养瓶,见图 1。



A: 原代第 6 天 BMSCs; B: 第 2 代 BMSCs; C: 第 3 代 BMSCs

图 1 BMSCs 原代及传代培养的细胞(×100)

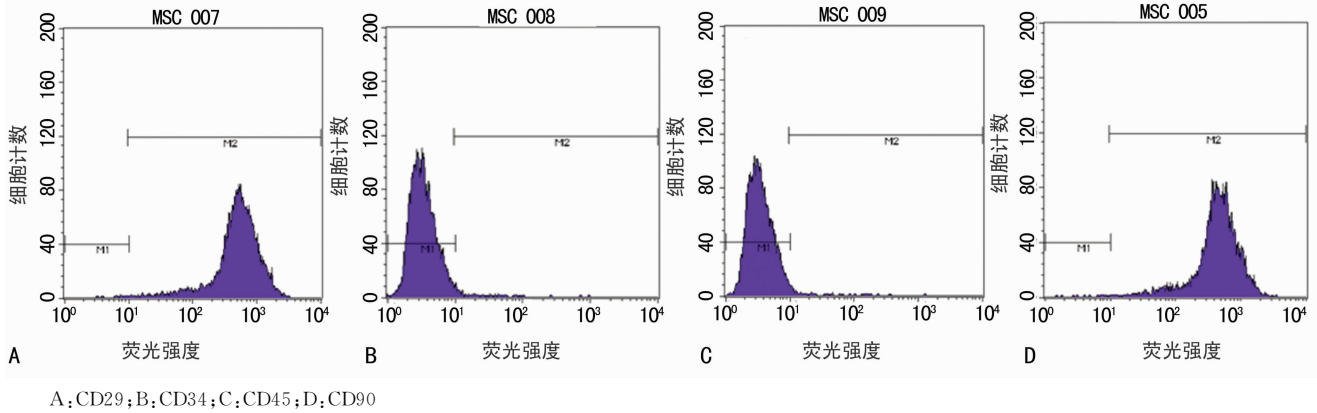
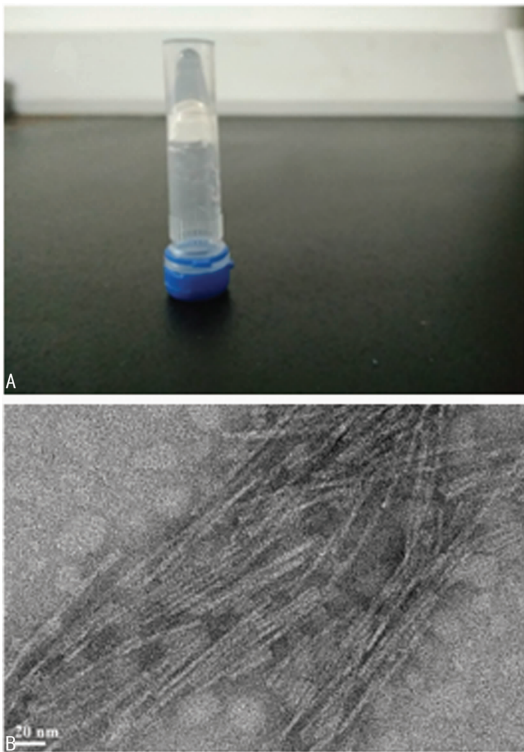


图 2 BMSCs 流式细胞检测

2.2 BMSCs 流式细胞鉴定 选取第 3 代 BMSCs 与 CD29、CD34、CD45、CD90 抗体结合后上机检测,结果显示 BMSCs 高表达 CD29(阳性率为 99.88%)、CD90(阳性率为 99.88%),不表达或低表达 CD34(阳性率为 1.64%)、CD45(阳性率为 1.59%),证明所培养的细胞为 BMSCs,见图 2。

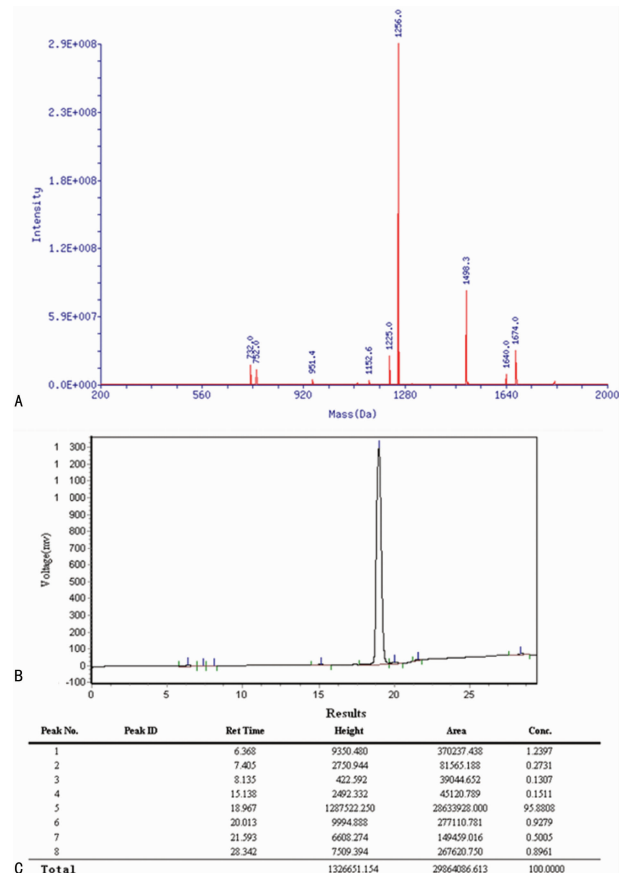
2.3 两性亲肽 RGD 环肽自组装成凝胶纳米支架 10 mg RGD 环两性亲肽溶于 400 μ L 0.1 mol/L NaOH,加入 400 μ L 双蒸水,用 0.1 mol/L HCl 调节至 pH 8,继续加入双蒸水至 1 mL,此时肽溶液为黏稠状态,加入等体积的无酚红 DEME/F12,数秒后成凝胶状态,TEM 观察凝胶由纳米纤维构成,纳米纤维直径 2~5 nm,长度 100~1 000 nm,纳米纤维相互交织成三维网络结构,见图 3。



A: 2 mL 小管瓶口倒置,凝胶紧贴瓶底,凝胶有较强的黏附力;B: TEM 下观察凝胶由纳米纤维交叉编织,纳米纤维之间存在间隙

图 3 两性亲肽 RGD 环肽自组装成凝胶纳米支架

2.4 RGD 环两性亲肽的检测结果 质谱结果显示, RGD 环两性亲肽相对分子质量为 1256.0,与目标肽相对分子质量的理论设计一致(图 4A);高效液相色谱分析显示,合成的 RGD 环两性亲肽纯度为 95.88%(图 4B、C),表明合成的 RGD 环两性亲肽是本研究的的目标肽。

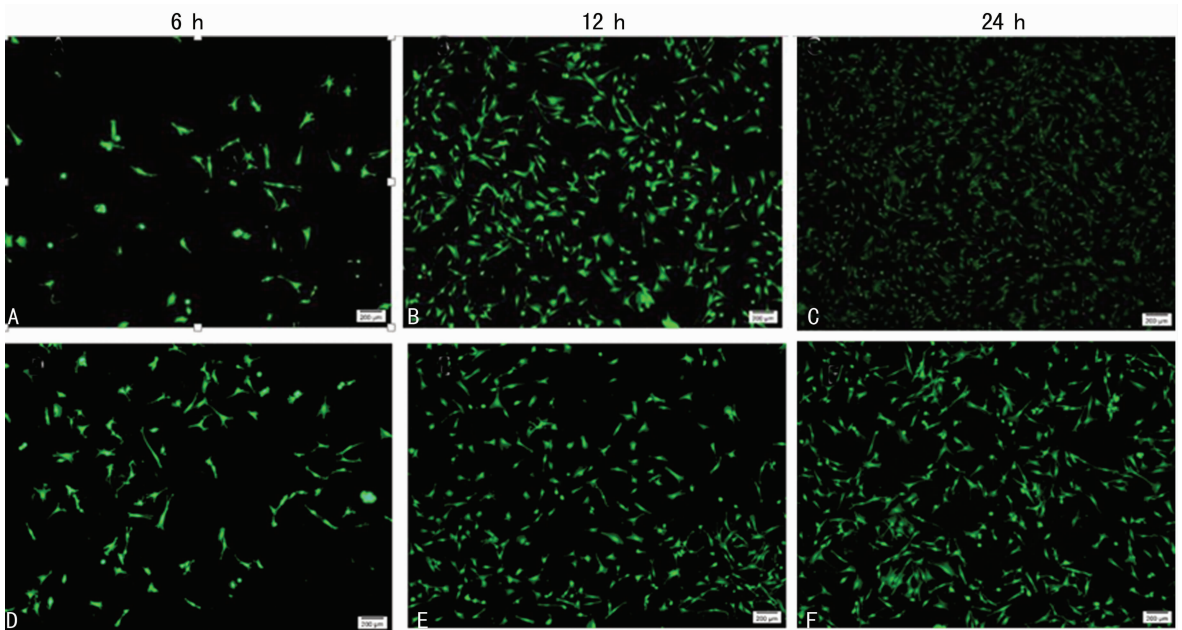


A: 质谱检测合成目标肽相对分子质量为 1256.0; B、C: 高效液相色谱检测合成目标肽的纯度为 95.88%,已达到目标肽浓度

图 4 RGD 环两性亲肽的检测结果

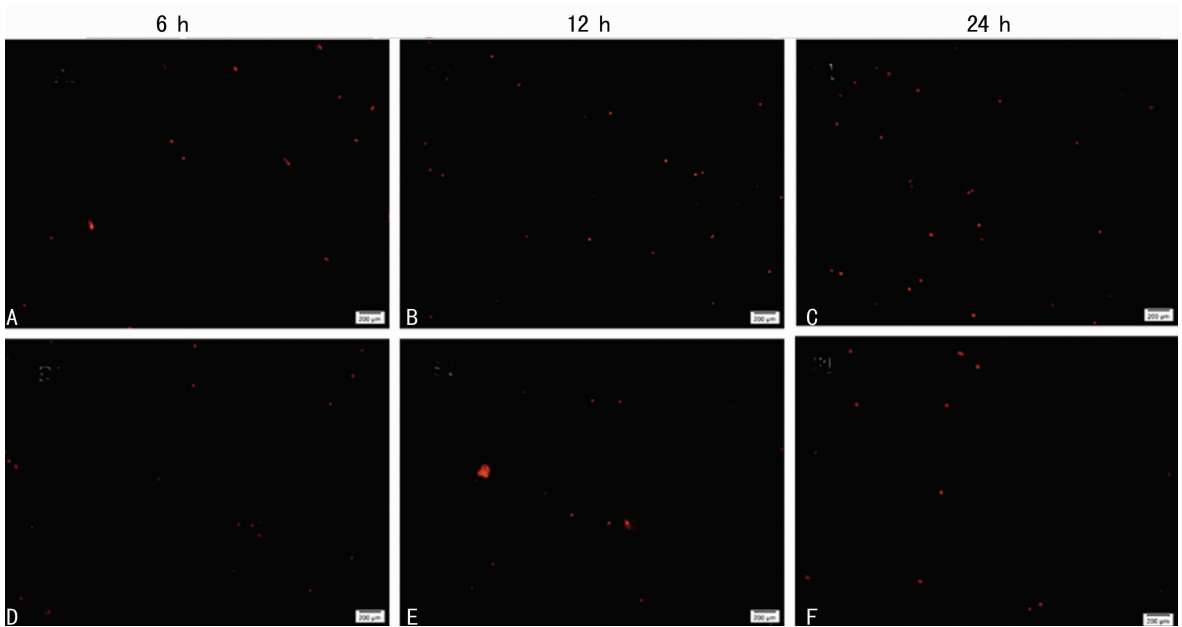
2.5 RGD 环两性亲肽纳米凝胶与 BMSCs 复合性培养结果 细胞分别在二维培养体系与三维细胞培养体系中培养 6、12、24 h 后分别进行钙黄绿素乙酰氧基甲酯和 PI 染色,细胞点计数活细胞与死细胞,随着细胞培养时间增加三维细胞培养体系活细胞数明显比二维细胞培养体系中多,差异有统计学意义 ($P < 0.05$),三维细胞培养体系中 6、12、24 h 活细胞数,见图 5A、B、C;二维细胞培养体系中 6、12、24 h 活细胞数,见图 5D、E、F;三维细胞培养体系死细胞(图 6A、B、C)与二维细胞培养体系死细胞(图 6D、E、F)未见增多。

2.6 CCK-8 测量两性亲肽对 BMSCs 增殖的影响 BMSCs 在三维细胞培养体系中增殖曲线与在二维细胞培养体系中增殖曲线见图 7,在三维细胞培养体系中 BMSCs 增殖速度比在二维细胞培养体系中 BMSCs 增殖速度快,差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。



A、B、C: 三维细胞培养体系; D、E、F: 二维细胞培养体系

图 5 三维与二维细胞培养体系活细胞



A、B、C: 三维细胞培养体系; D、E、F: 二维细胞培养体系

图 6 三维与二维细胞培养体系死细胞

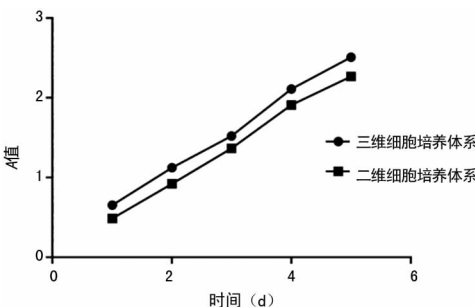


图 7 两性肽对 BMSCs 增殖的影响

3 讨 论

脊髓损伤主要为机械直接对脊髓造成的伤害,通常导致完全或不完整的神经功能丧失,如运动功能和感觉功能丧失^[4]。

脊髓损伤给患者带来心理和生理伤害,造成家庭巨大的经济负担,因此,迫切需要寻求一种有效的治疗脊髓损伤的方法。目前,神经组织工程是治疗脊髓损伤的有效方法。

生物材料包括有机材料、无机材料、金属材料三大类。由于无机材料及金属材料具有硬度大、韧性低、弹性差、可塑性差等特点,不适合用于神经组织工程;有机高分子材料具有在体内不易降解,或降解产物不能被机体利用且难以清除,以及其生物相容性差等缺点,也不宜作为神经组织工程的支架材料。利用两性肽自组装构建神经组织工程支架是较好的方法,其基本原理:肽分子在酸或细胞培养液(含钙、镁或氢等离子)作用下,通过分子内非共价键(氢键、疏水键、范德华力)等,自组装为三维多孔纳米纤维凝胶,形成纳米纤维直径较小,凝胶黏弹性可调控到与脊髓黏弹性一致,生物相容性好,降解产物为

氨基酸可被细胞利用。这种肽在细胞培养液促发下可自组装为纳米纤维凝胶,反应温和,条件简单,与其他材料相比具有明显优势,是构建神经组织工程较好的基质支架材料。

目前许多研究者通过改变氨基酸序列,设计出具有特定功能的肽链^[5],可模拟培养细胞所需要的生存环境,通过改变肽链的长短序列及带电性质,在 pH 7.35~7.45 发生自组装成多肽纳米凝胶结构,此纳米凝胶与细胞外基质相类似。由于多肽凝胶含水量较高且存在着间隙,为营养物质及细胞排泄物的运送提供了通道。多肽由天然的氨基酸合成,在体内不会进行排斥反应和炎性反应,凝胶在体内酶的作用下降解,给细胞提供生存养料。RGD 环肽序列为 C16H31OA3G4D2RGD,环肽具有的特性为:(1)C16H31O 序列提高对酸的敏感度,同时烷基尾可以调节纳米纤维之间的间隙^[6-7];(2)A3G4(AAAGGGG)与 C16H31O 烷基尾有协同作用^[8],同时能让活性 RGD 环表位暴露出来;(3)D2(DD)具有调节带电离子作用,当 RGD 环肽在自组装成凝胶时,凝胶的 pH 范围在 7.35~7.45 之间,正好适合细胞生长、增殖、分化^[8];(4)RGD 序列能促进细胞对凝胶的黏附、生长及分化^[1]。

本研究通过用高效液相色谱仪和质谱仪进行纯化和分析,结果证明所合成的 RGD 环肽为所需的目的肽。用 0.1 mol/L NaOH 溶液、0.1 mol/L HCl 溶液及无菌双蒸水将多肽调整浓度为 10 mg/mL,此时的多肽溶液呈黏稠状态,加入等体积含 Ca²⁺ 等二价阳离子无酚红的 DMEM/F12,数秒钟后多肽成凝胶状态,小管瓶口倒置,凝胶紧贴瓶底,有较强的黏附力,经电子显微镜观察凝胶发现凝胶由直径 2~5 nm,长度 100~1 000 nm 的纳米纤维构成,纳米纤维相互交织成三维网络结构。此类凝胶含水量 95.0%,对细胞有良好的骨架支持作用;营养物质、氧气及细胞所需要的活性因子可通过凝胶间隙到达细胞内,细胞内排泄物可通过间隙排出凝胶外。本实验采用全骨髓细胞差异贴壁法获取大鼠骨髓间充质干细胞^[9],通过细胞形态学观察,流式细胞仪检测细胞表面抗原,培养 2 周后的细胞呈漩涡式、鱼状排列,细胞表面 CD29、CD90 高表达,而 CD34、CD45 不表达,验证所取的细胞为骨髓间充质干细胞。

BMSCs 有许多优点,包括来源丰富、高活性、低免疫原性、分化潜能和分泌养分,在移植研究中已得到广泛的应用^[10]。BMSCs 可以分泌多种趋化因子、免疫调节因子和生长因子,这些因子可以进一步聚集其他细胞(包括炎性细胞),调节免疫应答,参与组织修复,影响病理进展^[11]。因此,BMSCs 为组织工程修复神经损伤较理想的种子细胞。

RGD 环两性亲肽纳米凝胶与 BMSCs 混合形成三维细胞培养体系,凝胶的三维结构具有良好的骨架结构,为细胞的生长提供支持作用;同时 RGD 环活性表位促进细胞对凝胶的黏附、生长及分化。本研究 CCK-8 结果显示,在三维细胞培养体系中 BMSCs 增殖速度比在二维细胞培养体系中快。由钙黄绿素乙氧基甲酯和 PI 构成的 DEAD/LIVE 试剂可通过荧光显微镜显色,观察细胞在二维及三维细胞培养体系的活力和增殖情况,活细胞染成绿色,死细胞染成红色^[12]。本研究结果显

示,随着培养时间的增加,三维细胞培养体系中的活细胞数较二维细胞培养体系中多。

综上所述,RGD 环肽与 BMSCs 具有很好的细胞相容性,可为以后在仿生材料涉及的神经组织工程中进行转基因改造奠定基础。

参考文献

- [1] Breyman C, Schmidt D, Hoerstrup SP. Umbilical cord cells as a source of cardiovascular tissue engineering[J]. *Stem Cell Rev*, 2006, 2(2): 87-92.
- [2] 元亮亮,梁鹏. 自组装多肽纳米纤维支架的结构特点及应用优势[J]. *中国组织工程研究*, 2013, 17(29): 5379-5386.
- [3] 陈睿,宋玉林,汪文玉,等. 大鼠骨髓间充质干细胞与树枝状两性亲肽自组装凝胶支架的生物相容性[J]. *西安交通大学学报(医学版)*, 2016, 37(6): 803-809.
- [4] Yip PK, Malaspina A. Spinal cord trauma and the molecular point of no return[J]. *Mol Neurodegener*, 2012, 7: 6.
- [5] Ruan L, Zhang H, Luo H, et al. Designed amphiphilic peptide forms stable nanoweb, slowly releases encapsulated hydrophobic drug, and accelerates animal hemostasis[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009, 106(13): 5105-5110.
- [6] Sargeant TD, Guler MO, Oppenheimer SM, et al. Hybrid bone implants: self-assembly of peptide amphiphilic nanofibers within porous titanium[J]. *Biomaterials*, 2008, 29(2): 161-171.
- [7] Hartgerink JD, Beniash E, Stupp SI. Self-assembly and mineralization of peptide-amphiphile nanofibers[J]. *Science*, 2001, 294(5547): 1684-1688.
- [8] 宋玉林,郑启新,郑剑锋,等. 两性亲肽自组装凝胶与神经干细胞相容性研究[J]. *组织工程与重建外科杂志*, 2008, 4(4): 192-195.
- [9] 李双月,戚媛,陈若琳,等. 全骨髓贴壁法分离培养大鼠骨髓间充质干细胞的生物学特性及优势[J]. *中国组织工程研究*, 2014, 18(10): 1484-1489.
- [10] Hu J, Deng G, Tian Y, et al. An in vitro investigation into the role of bone marrow derived mesenchymal stem cells in the control of disc degeneration[J]. *Mol Med Rep*, 2015, 12(4): 5701-5708.
- [11] Han X, Yang Q, Lin L, et al. Interleukin-17 enhances immunosuppression by mesenchymal stem cells[J]. *Cell Death Differ*, 2014, 21(11): 1758-1768.
- [12] 桑江玮,王素雅,张杰,等. 猪小肠黏膜下层细胞外基质促进肝细胞活力和功能基因表达的研究[J]. *中国修复重建外科杂志*, 2017, 31(5): 607-613.

(收稿日期:2017-07-12 修回日期:2017-09-15)

(上接第 4911 页)

- [14] Riedl SJ, Shi Y. Molecular mechanisms of caspase regulation during apoptosis[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2004, 5(11): 897-907.
- [15] Sionov RV, Vlahopoulos SA, Granot Z. Regulation of bim in health and disease[J]. *Oncotarget*, 2015, 6(27): 23058-23134.

- [16] Puthalakath H, Strasser A. Keeping killers on a tight leash: transcriptional and post-translational control of the pro-apoptotic activity of BH3-only proteins[J]. *Cell Death Differ*, 2002, 9(5): 505-512.

(收稿日期:2017-06-25 修回日期:2017-09-21)