

## 金黄色葡萄球菌 $\alpha$ -溶血素突变体 H35A 抑制 $\alpha$ -溶血素的细胞毒性

孙倩男<sup>1,2</sup>, 郑峰<sup>2</sup>, 周婷婷<sup>2</sup>, 岳岩<sup>3</sup>, 王怡雯<sup>2</sup>, 朱旭辉<sup>2</sup>, 王长军<sup>2</sup>, 余伯阳<sup>1\*</sup>, 朱进<sup>2\*</sup>

(<sup>1</sup>中国药科大学中药学院, 江苏 南京 211198; <sup>2</sup>南京军区军事医学研究所, 江苏 南京 210002; <sup>3</sup>中国人民解放军总医院传染科, 北京 100853)

**[摘要]** **目的:**研究金黄色葡萄球菌  $\alpha$ -溶血素( $\alpha$ -hemolysin, Hla)突变体 H35A 在人外周血单个核细胞(human peripheral blood mononuclear cells, hPBMC)和 THP-1 巨噬细胞中对于野生型 Hla 毒性作用的影响。**方法:**H35A 与 Hla 共同作用于 hPBMC 和 THP-1 巨噬细胞, 实时荧光定量 PCR 检测细胞中白介素(interleukin, IL)-1 $\beta$ 、IL-6、肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF)- $\alpha$  等炎症因子的 mRNA 转录水平差异, 台盼蓝染色计算 THP-1 巨噬细胞存活率。**结果:**预孵育突变体 H35A 1 h 的 hPBMC 和 THP-1 巨噬细胞, 经 Hla 刺激产生 IL-1、IL-6、TNF- $\alpha$  的 mRNA 转录水平显著降低;台盼蓝染色计数发现, H35A 与 Hla 共同作用的 THP-1 巨噬细胞存活率显著高于 Hla 单独处理组。**结论:**突变体 H35A 可抑制野生型 Hla 对于 hPBMC 和巨噬细胞的毒性作用, 为金黄色葡萄球菌早期感染防治药物的研发提供了更多选择。

**[关键词]**  $\alpha$ -溶血素; H35A 突变体; 炎症因子; 细胞毒性

**[中图分类号]** R378.1<sup>+</sup>1

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1007-4368(2017)03-0293-05

**doi:**10.7655/NYDXBNS20170307

## *Staphylococcus aureus* $\alpha$ -hemolysin mutant H35A inhibit cytotoxicity of wild $\alpha$ -hemolysin

Sun Qiannan<sup>1,2</sup>, Zheng Feng<sup>2</sup>, Zhou Tingting<sup>2</sup>, Yue Yan<sup>3</sup>, Wang Yiwen<sup>2</sup>, Zhu Xuhui<sup>2</sup>, Wang Changjun<sup>2</sup>, Yu Boyang<sup>1\*</sup>, Zhu Jin<sup>2\*</sup>

(<sup>1</sup>School of Traditional Chinese Pharmacology, Chinese Pharmaceutical University, Nanjing 211198; <sup>2</sup>Huadong Medical Institute of Biotechniques, Nanjing 210002; <sup>3</sup>Department of Infectious Disease, Chinese PLA General Hospital, Beijing 100853, China)

**[Abstract]** **Objective:** To study the effect of *Staphylococcus aureus*  $\alpha$ -hemolysin mutant H35A on the wild type  $\alpha$ -hemolysin (Hla) toxicity in human periphery blood mononuclear cells (hPBMC) and THP-1 macrophages. **Methods:** hPBMC and THP-1 macrophages were stimulated with both H35A and Hla. The transcriptions of interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), interleukin-6 (IL-6), tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) mRNA in hPBMC and THP-1 macrophages were assayed by real-time Q-PCR. The survival percentage of THP-1 macrophages treated with Hla and H35A was calculated with Trypan blue staining. **Results:** The transcriptions of IL-1, IL-6 and TNF- $\alpha$  mRNA in hPBMC and THP-1 macrophages treated with H35A mutant were significantly decreased upon stimulation with Hla. The survival percentage of THP-1 macrophages treated with Hla and H35A was significantly increased. **Conclusion:** H35A mutant can inhibit the toxic effect of Hla on human monocytes and macrophages, and it is expected to be a therapeutic drug used in the early stage of *Staphylococcus aureus* infection.

**[Key words]**  $\alpha$ -hemolysin; H35A mutant; inflammatory factor; cytotoxicity

[Acta Univ Med Nanjing, 2017, 37(03):293-297]

金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*, SA)是一类常见的定植于人体鼻腔与皮肤表面的共生菌, 是软组织及血液感染的常见原因, 且最终会发展为

细菌性疾病, 如肺炎、骨髓炎、感染性关节炎、多器官组织脓肿溃疡等<sup>[1]</sup>。SA 的致病性主要与其表达的多种与感染相关的致病毒素有关<sup>[2]</sup>, 而  $\alpha$ -溶血素( $\alpha$ -

**[基金项目]** 全军“十三五”医学科技重点项目(BWS14J046); 全军青年培育项目(14QNP041)

\*通信作者(Corresponding author), E-mail: zhujin1968@njmu.edu.cn; boyangyucpu@163.com

hemolysin, Hla)则是其分泌的重要毒力因子之一,其是约为 33 kDa 的水溶性单体蛋白,通过低聚化形成七聚体结构与靶细胞膜结合,在膜上形成孔道,造成  $\text{Ca}^{2+}$  内流、 $\text{K}^{+}$  等小分子外流,破坏细胞膜的完整性,导致细胞裂解<sup>[3]</sup>。同时胞内  $\text{Ca}^{2+}$  的升高会刺激膜磷脂水解以及花生四烯酸的代谢,引起内皮细胞和上皮细胞释放大一氧化氮,激活蛋白激酶,介导 NF- $\kappa$ B 的核转运<sup>[4-7]</sup>。这个过程伴随着大量白介素(interleukin, IL)- $1\beta$ 、IL-6、肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF)- $\alpha$  的产生,最终引起细胞死亡,刺激炎症细胞聚集,造成组织水肿<sup>[8-11]</sup>。研究显示,在细菌其他成分的协同作用下, Hla 还可通过诱导免疫细胞过度产生 IL- $1\alpha$  和 IL-6, 抑制巨噬细胞的吞噬活性,募集中性粒细胞<sup>[12]</sup>。

本课题组前期对 Hla 第 35 位氨基酸进行了定点突变,构建表达了 Hla 突变体 H35A,发现该突变体可抑制 Hla 对肺上皮细胞 A549 的细胞毒效性,有望成为 SA 感染早期的潜在治疗药物<sup>[13]</sup>。但对于突变体 H35A 是否能有效抑制 Hla 对人血中免疫细胞的毒性、减少炎症反应的产生还未见相关报道。本研究利用人外周血单个核细胞(human peripheral blood mononuclear cells, hPBMC)和 THP-1 巨噬细胞系,通过检测 Hla 作用后 IL- $1\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$  等炎症因子的 mRNA 转录水平的变化和细胞存活率差异,研究突变体 H35A 是否能抑制 Hla 对 hPBMC 和巨噬细胞的毒性作用。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

THP-1 细胞株(ATCC 公司,美国),hPBMC 由正常健康志愿者提供的人血分离得到;RPMI 1640、青链霉素、HEPES、胎牛血清(FBS)、台盼蓝(0.4%)(Gibco 公司,美国),佛波酯(phorbol ester, PMA)(Sigma 公司,美国);Fast 200 总 RNA 极速抽提试剂盒(上海飞捷公司),Quanti Nova™ SYBR Green PCR Kit (Qiagen 公司,德国),Trans Script II All-in-One First-Strand cDNA Synthesis Super Mix for qPCR (One-Step gDNA Removal)(北京全式金生物技术有限公司);10 kDa 蛋白超滤管(Millipore 公司,美国);定量 PCR 引物由南京金斯瑞生物技术有限公司合成。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 Hla 和 H35A 蛋白的纯化

过表达 Hla 和 H35A 蛋白的工程菌由中国疾病预防控制中心梁旭东研究员惠赠<sup>[13]</sup>,用 HiTrap QFF

柱纯化两种蛋白。柱层析的洗脱液 A 相为:50 mmol/L  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 50 mmol/L  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ; B 相为:50 mmol/L  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 50 mmol/L  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 1 mol/L NaCl。纯化前先将 2 株细菌培养上清分别用 10 kDa 超滤管浓缩后用 A 相稀释,纯化时用 0~50% B 相梯度洗脱获得目的蛋白。浓缩后进行 SDS-PAGE 电泳,紫外分光光度仪检测浓度。

#### 1.2.2 细胞培养

THP-1 巨噬细胞的制备:THP-1 细胞接种于含 10% 胎牛血清、1% 青链霉素、1% HEPES 的 RPMI 1640 培养液中,37℃、5%  $\text{CO}_2$ 、饱和湿度下培养。实验前 3 d,取对数生长期 THP-1 细胞,800 r/min 离心 5 min,用 RPMI 1640 培养液洗 2 次,计数细胞达到  $5 \times 10^5$  个/孔,在 24 孔板继续培养,用终浓度 10 ng/mL PMA 诱导 THP-1 细胞 48 h 使其转化为成熟的巨噬细胞,换无血清的 RPMI 1640 培养液继续培养 12 h,用于随后的实验。

hPBMC 分离与培养:取正常健康志愿者外周静脉血 5 mL 于 50 mL 细胞离心管,加 35 mL 生理盐水,肝素抗凝,细胞悬液小心加入约 15 mL 淋巴细胞分离液上,2 000 r/min 离心 20 min;收集血浆层和淋巴细胞分离液交界面的细胞并用生理盐水充分洗涤,加入红细胞裂解液作用 3 min,再加入含体积分数 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养液离心并重悬细胞,将所得 hPBMC 均匀接种于 24 孔培养板,每孔细胞数约为  $5 \times 10^5$  个。37℃、5%  $\text{CO}_2$ 、饱和湿度下培养 12 h,用于随后实验。

#### 1.2.3 Hla 和 H35A 作用于 hPBMC

分别将终浓度 0.1、1.0、10.0  $\mu\text{g/mL}$  的 H35A 蛋白同 hPBMC 预孵育 1 h,再加入终浓度 1.0  $\mu\text{g/mL}$  Hla 作用细胞 4 h。同时设立空白对照组,每组设 3 个复孔。处理结束后,荧光定量 PCR 检测各组细胞中 IL- $1\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$ 、IL-10 和 IFN- $\beta$  等细胞因子 mRNA 转录水平的差异。

#### 1.2.4 Hla 和 H35A 作用于 THP-1 巨噬细胞

取铺满孔底的 THP-1 巨噬细胞,设置空白对照组、单加 Hla 作用 4 h 组、H35A 预孵育细胞 1 h 后再加 Hla 作用 4 h 组。根据之前的实验结果确定 Hla 与 H35A 的终浓度均为 1.0  $\mu\text{g/mL}$ , 每组设 3 个复孔。检测比较各组细胞中 IL- $1\beta$ 、IL-6 和 TNF- $\alpha$  mRNA 水平的差异。

#### 1.2.5 细胞因子的 Q-PCR 检测

提取细胞总 RNA,紫外分光光度仪检测 RNA 浓度。随机引物逆转录成 cDNA 后,荧光定量 PCR

检测各组细胞中 IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$  等炎症因子的 mRNA 转录水平, 引物序列见表 1。PCR 反应体系如下: 10.0  $\mu$ L SYBR Green PCR Master Mix, 上下游引物各 0.4  $\mu$ L, cDNA 2.0  $\mu$ L, 双蒸水 7.2  $\mu$ L。反应条件为: 95 $^{\circ}$ C 2 min; 95 $^{\circ}$ C 5 s, 60 $^{\circ}$ C 30 s 共 40 个循环。反应结束后作熔解曲线。目的基因 mRNA 转录水平

的变化以  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  值表示。

### 1.2.6 台盼蓝染色检测 H35A 对 Hla 诱导的 THP-1 巨噬细胞毒性的影响

取铺满孔底的 THP-1 巨噬细胞, 设置空白对照组、单加 Hla 作用组、以及 H35A 和 Hla 共同作用组, Hla 与 H35A 的终浓度均为 1.0  $\mu$ g/mL。37 $^{\circ}$ C、5%

表 1 荧光定量 PCR 引物序列

Table 1 Primer sequences of fluorescent quantitative PCR

基因	上游(5'→3')	下游(5'→3')
GAPDH	ACAACCTTGGTATCGTGGAAGG	GCCATCACGCCACAGTTTC
IL-1 $\beta$	ATGATGGCTTATTACAGTGGCAA	GTCGGAGATTCTAGCTGGA
IL-6	ACTCACCTCTTCAGAACGAATTG	CCATCTTTGGAAGGTTACAGTTG
TNF- $\alpha$	CCTCTCTCTAATCAGCCCTCTG	GAGGACCTGGGAGTAGATGAG
IFN- $\beta$	ATGACCAACAAGTGCTCTCTCC	GGAATCCAAGCAAGTTGTAGCTC
IL-10	GACTTTAAGGGTTACCTGGGTTG	TCACATGCGCCTTGATGCTCTG

CO<sub>2</sub>、饱和湿度下培养 24 h 后收集细胞, 经 0.4% 台盼蓝染色后, 显微镜下拍照并计数活细胞, 根据以下公式统计细胞存活率: 细胞存活率(%) = 未染色细胞/观察细胞总数  $\times$  100%。

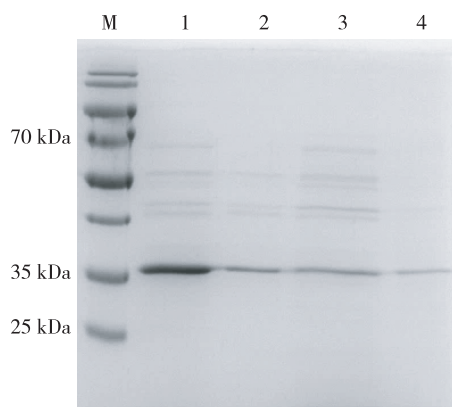
### 1.3 统计学方法

采用 Graph Pad Prism 5 分析数据并作图, 多组样本比较采用单因素方差分析, 两两比较采用 LSD-*t* 检验,  $P \leq 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 Hla 和 H35A 蛋白的纯化

Hla 是一种外分泌毒素, 因此以 SA 为宿主菌对其进行过表达。将基因工程菌的培养液上清用超滤管浓缩, 再利用 HiTrap QFF 柱纯化, 最终得到纯度较高的目的蛋白(图 1)。紫外分光光度计测得 Hla 浓度为 0.8 mg/mL, H35A 浓度为 0.3 mg/mL。



M: 蛋白 marker; 1: 未纯化 Hla; 2: 纯化后的 Hla; 3: 未纯化 H35A; 4: 纯化后的 H35A。

图 1 Hla 和 H35A 蛋白的纯化

Figure 1 SDS-PAGE analysis of Hla and H35A protein

### 2.2 H35A 对 Hla 刺激 hPBMC 产生 IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$ 等的影响

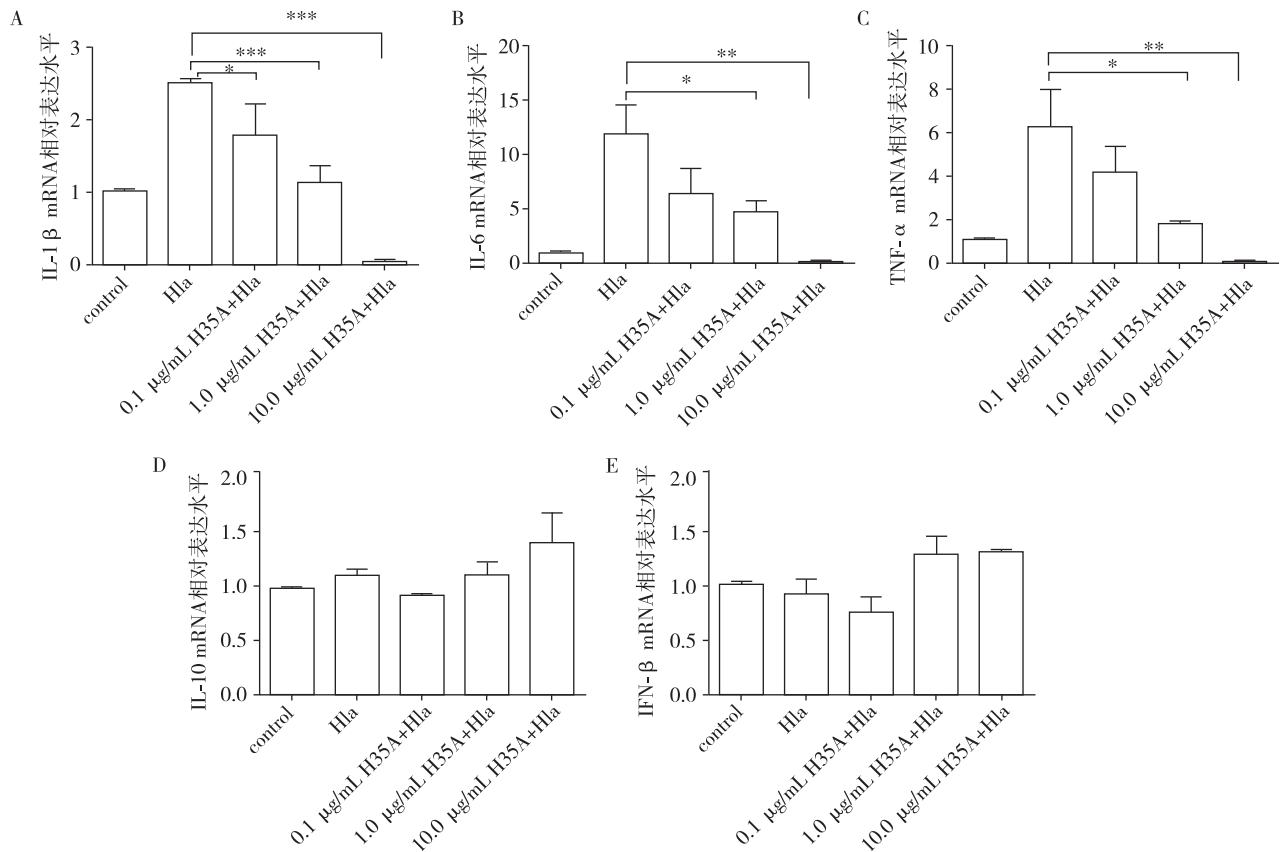
以 0.1、1.0、10.0  $\mu$ g/mL 的 H35A 与 hPBMC 预孵育 1 h 后, 再加入终浓度 1.0  $\mu$ g/mL Hla 作用细胞 4 h, 定量 PCR 检测 IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$ 、IL-10 和 IFN- $\beta$  的 mRNA 转录水平。结果显示, 单加 Hla 组与空白对照组相比, IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$  的 mRNA 转录水平显著升高; 终浓度 1.0  $\mu$ g/mL 的 H35A 可显著降低 Hla 刺激的 hPBMC 中 IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$  的 mRNA 转录水平 ( $P < 0.05$ ); 而终浓度 0.1  $\mu$ g/mL 的 H35A 处理组中仅 IL-1 $\beta$  的 mRNA 水平有统计学差异 ( $P < 0.05$ ), 其余因子无变化; 终浓度 10.0  $\mu$ g/mL 的 H35A 处理组中 IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$  的 mRNA 转录水平则较 1.0  $\mu$ g/mL 组降低更为明显, 甚至低于空白对照组(图 2A~C)。而 IL-10 和 IFN- $\beta$  的 mRNA 水平在所有实验组中均无明显变化(图 2D, E)。

### 2.3 H35A 对 Hla 刺激 THP-1 巨噬细胞产生细胞因子的影响

与空白对照组相比, 经 Hla 刺激 4 h 后的 THP-1 巨噬细胞组 IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$  的转录水平显著升高; 而相较于 Hla 单独刺激组, 预孵育 1.0  $\mu$ g/mL H35A 蛋白 1 h, 炎症因子 IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$  的转录水平显著降低 ( $P < 0.05$ , 图 3)。

### 2.4 台盼蓝染色检测 Hla 的细胞毒性

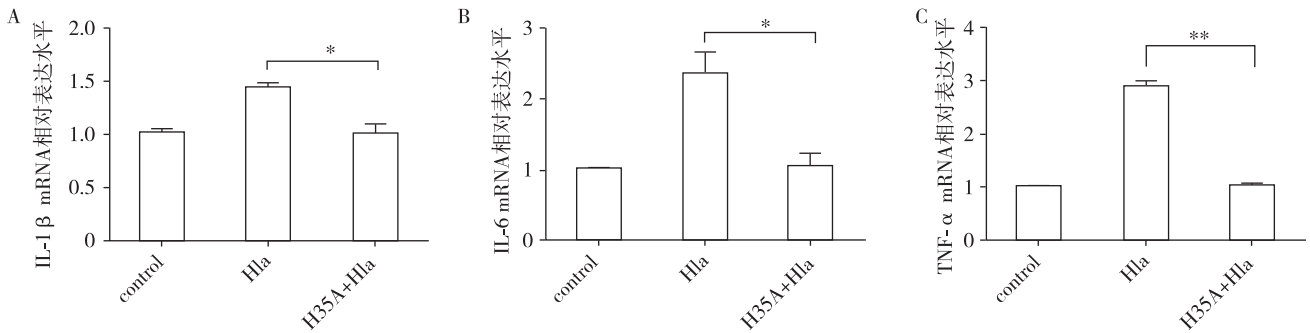
台盼蓝染色发现, 与 Hla 单独刺激 24 h 后的 THP-1 巨噬细胞组比较, 1.0  $\mu$ g/mL H35A 与 Hla 共同作用的 THP-1 巨噬细胞组中, 蓝染细胞明显减少, 细胞存活率显著升高 ( $P < 0.01$ , 图 4)。



两组比较, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ 。

图 2 不同浓度 H35A 对 H1a 作用下 hPBMC 产生 IL-1β(A)、IL-6(B)、TNF-α(C)、IL-10(D)、IFN-β(E) 的影响

Figure 2 Effects of different concentrations of H35A on the expressions of IL-1β(A), IL-6(B), TNF-α(C), IL-10(D) and IFN-β(E) mRNA in hPBMC



两组比较, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ 。

图 3 H35A 对 H1a 作用下 THP-1 巨噬细胞产生 IL-1β(A)、IL-6(B)、TNF-α(C) 的影响

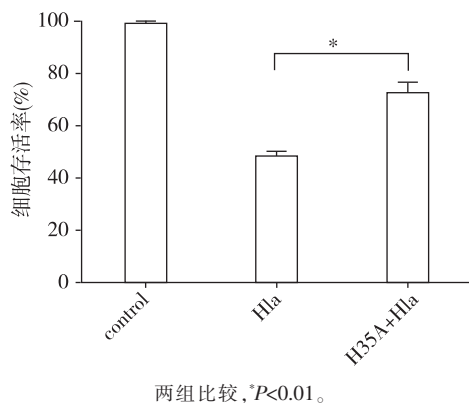
Figure 3 Effects of the H35A on the expressions of IL-1β(A), IL-6(B) and TNF-α(C) mRNA in THP-1 macrophages

### 3 讨论

SA 感染最主要的特点即皮肤坏死和严重感染, 而炎性因子既可作为效应分子在组织炎症反应中发挥作用, 也可作为炎症反应的信号分子。IL-6、TNF-α、IL-1β 等可促进炎症细胞释放炎性介质、水解酶, 导致病变部位血流增多、血管通透性增加, 局部充血、水肿、渗出, 细胞变性、坏死。同时, 这些炎性因

子又可激活 NF-κB, 进一步加重炎症和组织坏死反应<sup>[14]</sup>。H1a 作为 SA 感染最主要的毒力因子, 其低聚化形成七聚体后在细胞膜上形成孔道, 破坏细胞膜完整性导致细胞裂解, 并伴随大量氧化代谢产物和炎性因子释放, 造成组织损伤。H1a 的低聚化及其与细胞膜的结合都离不开细胞受体 ADAM10<sup>[15]</sup>。该受体是一种锌依赖的金属蛋白酶, 属于 I 型跨膜蛋白家族, 在多种细胞表面表达<sup>[16-17]</sup>。





两组比较, \* $P < 0.01$ 。

图 4 台盼蓝染色观察 H35A 对 Hla 作用下 THP-1 巨噬细胞存活率的影响

Figure 4 Survival percentage of THP-1 macrophages treated with Hla and H35A by Trypan blue staining

本研究观察了 H35A 对 Hla 刺激的 THP-1 巨噬细胞以及 hPBMC 中 IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$  等转录水平的影响,结果显示终浓度 1.0  $\mu\text{g/mL}$  的 H35A 预作用细胞可明显下调 Hla 诱导的 IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$  表达;但两种蛋白对于免疫细胞中抑炎因子 IL-10 和 IFN- $\beta$  的转录均无影响。同时,H35A 可以显著抑制 SA 的 Hla 对 THP-1 巨噬细胞系的细胞毒作用。推测 H35A 可能通过与 Hla 竞争性结合细胞表面受体如 ADAM10、 $\alpha 5\beta 1$  整合素等,干扰 Hla 的低聚化及其与细胞膜的结合,导致细胞膜上孔道形成减少,细胞中炎性因子表达水平降低,从而抑制 Hla 的细胞毒性。但是其具体作用机制还需要通过后续实验进一步证实。

综上所述,SA Hla 的突变体 H35A 可显著降低野生型 Hla 诱导 hPBMC 和 THP-1 巨噬细胞产生的炎性反应,继而抑制其细胞毒性作用,有望改造成成为一种控制 SA 早期感染的新型辅助药物。

#### [参考文献]

[1] Thamavongsa V, Kim HK, Missiakas DA. Staphylococcal manipulation of host immune responses[J]. Nat Rev Microbiol, 2015, 13(9): 529-543

[2] Otto M. Basis of virulence in community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* [J]. Annu Rev Microbiol, 2010, 64(1): 143-162

[3] Berube BJ, Wardenburg JB. *Staphylococcus aureus* alpha-toxin: Nearly a century of intrigue[J]. Toxins (Basel), 2013, 5(6): 1140-1166

[4] Grimminger F, Rose F, Sibelius U, et al. Human endothelial cell activation and mediator release in response to the bacterial exotoxins *Escherichia coli* hemolysin and

staphylococcal alpha-toxin[J]. J Immunol, 1997, 159(4): 1909-1916

[5] Suttorp N, Seeger W, Dewein E, et al. Staphylococcal alpha-toxin-induced PGI<sub>2</sub> production in endothelial cells: Role of calcium[J]. Am J Physiol, 1985, 248(1): 127-134

[6] Rose F, Dahlem G, Guthmann B, et al. Mediator generation and signaling events in alveolar epithelial cells attacked by *S-aureus* alpha-toxin[J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2002, 282(2): L207-L214

[7] Suttorp N, Fuhrmann M, Tannert-Otto S, et al. Pore-forming bacterial toxins potently induce release of nitric oxide in porcine endothelial cells [J]. J Exp Med, 1993, 178(1): 337-341

[8] Craven RR, Gao X, Allen IC, et al. *Staphylococcus aureus* alpha-hemolysin activates the NLRP3-inflammasome in human and mouse monocytic cells[J]. PLoS One, 2009, 4(10): 7446

[9] Seeger W, Birkemeyer RG, Ermer L, et al. Staphylococcal alpha-toxin-induced vascular leakage in isolated perfused rabbit lungs[J]. Lab Invest, 1990, 63(3): 341-349

[10] Buerke M, Sibelius U, Grandel U, et al. *Staphylococcus aureus* alpha toxin mediates polymorphonuclear leukocyte-induced vasoconstriction and endothelial dysfunction[J]. Shock, 2002, 17(1): 30-35

[11] Suttorp N, Hessz T, Seeger W, et al. Bacterial exotoxins and endothelial permeability for water and albumin *in vitro* [J]. Am J Physiol, 1988, 255(3): 368-376

[12] 廖明喻, 逢 龙, 杨娅丽, 等. 金黄色葡萄球菌主要毒力因子对宿主固有免疫系统的影响[J]. 微生物学杂志, 2015, 35(5): 102-107

[13] Liang X, Ji Y. Alpha-toxin interferes with integrin-mediated adhesion and internalization of *Staphylococcus aureus* by epithelial cells[J]. Cell Microbiol, 2006, 8(10): 1656-1668

[14] 周 馨, 马筱玲, 常文娇, 等. 金黄色葡萄球菌 PV-杀白细胞素对 THP-1 巨噬细胞活性及凋亡/坏死的作用[J]. 安徽医科大学学报, 2012, 47(12): 1389-1392

[15] Georgia A, Juliane BW. Role of a disintegrin and metalloprotease 10 in *Staphylococcus aureus*  $\alpha$ -hemolysin-mediated cellular injury[J]. J PNAS, 2010, 107(30): 13473-13478

[16] Seals DF, Courtneidge SA. The ADAMs family of metalloproteases: multidomain proteins with multiple functions [J]. Genes Dev, 2003, 17(1): 7-30

[17] Edwards DR, Handsley MM, Pennington CJ. The Adam metalloproteinases [J]. Mol Aspects Med, 2008, 29(5): 258-289

[收稿日期] 2016-09-01