

肺炎支原体肺炎患儿血液中差异表达 miRNAs 的筛选及鉴定

张佳敏¹, 周 瑶¹, 莫珍珍^{1,2}, 刘 峰¹, 唐 珩^{1*}, 赵德育¹¹南京医科大学附属儿童医院呼吸科, 江苏 南京 210008; ²马鞍山市十七冶医院儿科, 安徽 马鞍山 243000

[摘要] 目的:筛选鉴定与肺炎支原体肺炎相关的特异性 miRNAs。方法:收集肺炎支原体肺炎患儿的血液,通过 miRNA 芯片技术分析肺炎支原体肺炎患儿和正常人血液淋巴细胞中 miRNAs 的表达谱变化,通过 RT-PCR 方法验证芯片检测结果的准确性,确认与肺炎支原体肺炎相关的特异性 miRNAs。利用靶基因软件预测各自可能的靶基因,利用 RT-PCR 验证 mRNA 表达差异。结果:肺炎支原体肺炎患儿血液淋巴细胞中筛选出表达上调的 miRNA 105 个,表达下调的 133 个。其中上调(大于 5 倍)的 30 个,上调(大于 10 倍)的 10 个,下调(小于 0.5 倍)的 133 个($P<0.05$)。选取表达差异显著的 miR-20a-3p、miR-100-5p、miR-93-5p 以及 let-7b-5 进行后续 RT-PCR 的验证,结果与芯片一致;Bcl-2、IGF-1R、PTEN、TGF β 1 mRNA 表达有不同程度的降低。结论:miRNAs 在肺炎支原体肺炎患儿血液淋巴细胞中存在差异表达,而这些差异表达的 miRNAs 及其潜在靶基因可能参与肺炎支原体导致的感染与免疫反应。

[关键词] 肺炎支原体;miRNA;靶基因**[中图分类号]** R725.6**[文献标志码]** A**[文章编号]** 1007-4368(2017)05-0620-05**doi:** 10.7655/NYDXBNS20170521Identification of differentially expressed bloody miRNAs in children with *Mycoplasma pneumoniae pneumonia*Zhang Jiamin¹, Zhou Yao¹, Mo Zhenzhen^{1,2}, Liu Feng¹, Tang Heng^{1*}, Zhao Deyu¹¹Department of Respiratory Medicine, the Affiliated Children's Hospital of NJMU, Nanjing 210008; ²Department of Pediatrics, Ma'anshan MCC 17 Hospital, Maanshan 243000, China)

[Abstract] **Objective:** To explore related miRNAs to *Mycoplasma pneumoniae* (*Mp*) caused respiratory infections and immune reaction. **Methods:** Blood of children with *Mp* pneumonia (MPP) was collected. By miRNA microarray technology, miRNAs expression differences in lymphocytes were analysed between MPP and control group. RT-PCR was used to verify the accuracy of microarray results. Specific miRNAs associated with MPP were explored. Target gene software was used to predict the possible target genes, and RT-PCR was used to verify the mRNA expression difference. **Results:** Compared with normal group, in MPP group 105 miRNAs increased (with 30 more than 5 fold change, 10 more than 10) and 133 decreased (with 133 less than 0.5 fold) ($P<0.05$). Significantly differentially expressed miRNAs: miR-20a-3p, miR-100-5p, miR-93-5p, and let-7b-5p increased detected by RT-PCR, and were consistent with the array results. As potential target genes, Bcl-2, IGF-1R, PTEN, and TGF β 1 mRNA expression decreased. **Conclusion:** miRNAs differential expressed in blood lymphocytes in children with MPP, and the difference may be involved in infection and the immune response caused by *Mp*.

[Key words] *Mycoplasma pneumoniae*; miRNA; target gene

[Acta Univ Med Nanjing, 2017, 37(05):0620-624]

肺炎支原体(*Mycoplasma pneumoniae*, *Mp*)是小儿社区获得性肺炎的主要病原体,可以引起轻重不等的呼吸道感染,并可累及多个器官系统。近年来,

有研究发现年幼儿童感染率有所增加,且重症支原体肺炎及难治性支原体肺炎患者有所增多。目前已知 *Mp* 能够通过直接损害及诱导机体免疫应答对呼吸道上皮及纤毛进行持续损害,且宿主不能有效清除病原体,导致感染状态持续存在。因此,进一步研究 *Mp* 的致病机制有着迫切的现实需求。

近年来,有研究表明微小 RNA(miRNA)已作为

[基金项目] 国家自然科学基金(青年科学基金项目)(81200012)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: tanham@sina.cn

一类全新的基因调控分子参与基因转录后水平调控^[1]。目前认为 miRNA 与支气管哮喘、过敏性鼻炎、特应性皮炎、肿瘤、心血管疾病、血液系统疾病、神经系统疾病及糖尿病等疾病的发生密切相关,但有关 miRNA 在病原体感染与免疫中的作用还鲜有报道。本实验通过康成公司的 miRNA 芯片筛选肺炎支原体肺炎(*Mycoplasma pneumoniae pneumonia*, MPP)患儿和正常人血液淋巴细胞中存在差异表达的 miRNAs,选取差异性表达显著的 miRNAs,通过 RT-PCR 方法验证芯片检测结果的准确性,并验证 miRNA 潜在靶基因 mRNA 表达水平的改变,为后期的功能研究提供理论依据。

1 对象和方法

1.1 对象

病例选自 2014 年 1—4 月在南京医科大学附属儿童医院呼吸科病房住院并确诊的 MPP 患儿 12 例,其中男 6 例,女 6 例,年龄 2~14 岁,平均 3.5 岁,诊断均符合第 7 版实用儿科学有关 MPP 的诊断标准。排除常见的其他细菌和病毒感染,不伴有肺结核、支气管哮喘等其他呼吸系统疾病且留取标本前未使用大环内酯类、糖皮质激素及免疫调节剂。

对照组共 12 例,男 6 例,女 6 例,年龄 1~9 岁,平均年龄 5.5 岁,均为外科系统准备择期手术住院的患儿,近期无感染和慢性疾病史,且排除过敏性和免疫相关性疾病。

1.2 方法

1.2.1 淋巴细胞的分离

取新鲜抗凝血 2 mL,与磷酸盐缓冲液(PBS)1:1 混匀后,缓慢加于 4 mL 细胞分离液的液面上,以 400 g 离心 20 min,此时离心管自上而下分为 4 层,第 1 层为血浆层,第 2 层环状乳白色淋巴细胞层,第 3 层为透明分离液层,第 4 层为红细胞层。收集第 2 层细胞放入已加 5 mL PBS 的离心管中,混匀后,400 g 离心 20 min,经反复洗涤 2 次后,收集细胞,加 TRIzol 后置于 -80℃ 备用。

1.2.2 基因芯片

委托上海康成生物公司完成 miRNA 芯片检测。

1.2.3 实时荧光定量 PCR

用 TRIzol 一步法提取总 RNA,经电泳显示 28S、18S 和 5S 清晰 3 条带,测定 $D(260\text{ nm})/D(280\text{ nm})$ 比值大于 1.8,定量后取总 RNA 进行反转录反应,反应体系 10 μL ,反应条件 42℃ 15 min,85℃ 5 s,4℃ 10 min,取 cDNA 为模板进行实时荧光定量 PCR 扩

增,反应体系 20 μL ,反应条件 95℃ 30 s,95℃ 3 s,60℃ 30 s 循环 40 次,各样品的目的 miRNA 和内参(U6)分别进行实时荧光定量 PCR,数据采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法进行分析。

1.2.4 预测靶基因

利用 microRNA.org 和 TargetScan 数据库进行可能的靶基因预测,取交集得到的可信度和准确性较高的靶基因,采用实时荧光定量 PCR 测量各样品的可能靶基因 mRNAs 和内参(GAPDH),数据采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法进行分析。

1.3 统计学方法

芯片结果采用 Significance Analysis of Microarrays(SAM, version 2.1)进行分析。中值校正法获得校正后的标准化数值,标准化数据=原始值-背景值/中位数。

RT-PCR 结果应用 SPSS20.0 进行分析,数据以均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,两小样本均数之间的比较经方差齐性检验后,采用完全随机化设计 t 检验, $P\leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 初步建立 MPP 患儿血液淋巴细胞中 miRNA 基因的异常表达谱

与正常儿童相比,利用芯片技术,我们在 MPP 患儿外周血淋巴细胞中初步筛选出 105 个上调表达的 miRNA 基因和 133 个下调表达(小于 0.5 倍)的 miRNA 基因($P<0.05$)。上调大于 5 倍的基因 30 个,大于 10 倍的 10 个(表 1),miR-20a-3p、miR-100-5p、miR-93-5p 以及 let-7b-5p 表达显著上调。

2.2 MPP 患儿与正常儿童血液淋巴细胞中表达显著差异的 miRNAs

通过 real-time PCR 技术检测两组淋巴细胞中 miRNA 表达变化。结果证实,MPP 组患儿血淋巴细胞中 miR-20a-3p、miR-100-5p、miR-93-5p 以及 let-7b-5p 均有明显升高,与芯片结果一致(P 均 <0.05 ,图 1)。

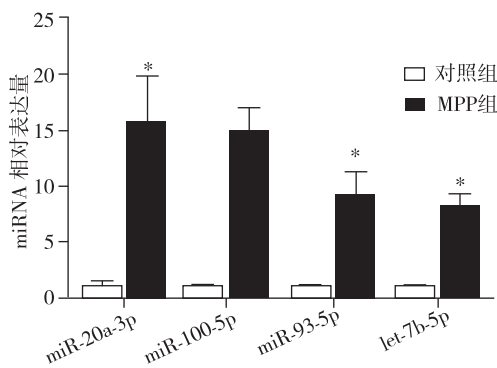
2.3 通过生物信息学预测 miRNA 靶基因并以实时定量 PCR 验证

通过 microRNA.org 和 Target Scan 软件预测 miR-20a-3p、miR-100-5p、miR-93-5p 以及 let-7b-5p 的潜在靶基因,结合阅读文献,筛选出可能参与 MPP 发生发展的靶基因,分别为 Bcl-2、IGF-1R、PTEN、TGF β 1。接下来,利用实时定量 PCR 技术,检测两组外周血淋巴细胞中所筛选靶基因 mRNA 表达量变化。扩增片段的引物如下(5'→3'):Bcl-2:F:

表 1 MPP 患儿相对正常儿童血液淋巴细胞中 miRNAs 的芯片检测结果

Table 1 Chip test of miRNAs in blood lymphocytes in children with MPP and healthy children

序号	名称	表达倍数
145831	hsa-miR-20a-3p	97.73
145943	hsa-miR-548at-5p	44.22
169213	hsa-miR-4507	34.60
169018	hsa-miR-625-5p	29.32
169358	hsa-miR-100-5p	26.47
30687	hsa-miR-4768-3p	18.26
147165	hsa-miR-4640-5p	13.46
27720	hsa-miR-4417	13.24
17506	hsa-miR-93-5p	11.53
11073	hsa-let-7b-5p	10.89
17928	hsa-miR-15a-5p	7.54
168578	hsa-miR-24-3p	7.40
17676	hsa-miR-34b-5p	7.38
146151	hsa-miR-181a-2-3p	7.21
169128	hsa-miR-5190	7.21
32884	hsa-miR-152-3p	7.13
17944	hsa-miR-449c-5p	7.09
169420	hsa-miR-4510	6.73
27568	hsa-miR-342-3p	6.61
46872	hsa-miR-337-5p	6.29
169227	hsa-miR-193b-5p	6.20
168998	hsa-miR-744-5p	6.01
42638	hsa-miR-1262	5.77
10943	hsa-miR-3064-5p	5.77
10919	hsa-miR-4508	5.72
46918	hsa-miR-23a-5p	5.59
17668	hsa-miR-136-5p	5.40

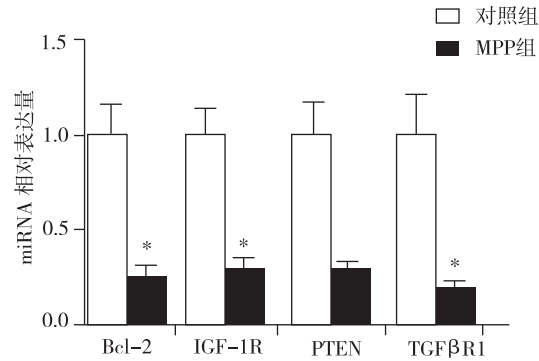


与对照组比较, *P<0.05, n=12。

图 1 MPP 患儿与正常儿童血液淋巴细胞中差异表达的 miRNAs

Figure 1 Differentially expressed miRNAs in blood lymphocytes between children with MPP and healthy children

GGTGGGGTCATGTGTGTGG,R:CGGTTTCAGGTACTCAGTCATCC;IGF-1R:F:TCGACATCCGCAACGACTATC,R:CCAGGGCGTAGTTGTAGAAGAG;PTEN:F:TGGATTCGACTTAGACTTGACCT,R:GGTGGGTTATGGTCTTCAAAGG;TGFβ R1:F:ACGGCGTTACAGTGTTTCTG,GCACATACAAACGGCCTATCTC。结果表明,肺炎组外周血淋巴细胞中 Bcl-2、IGF-1R、PTEN、TGFβR1 mRNA 表达均有不同程度下降(图 2)。



与对照组比较, *P<0.05, n=12。

图 2 MPP 患儿与正常儿童血液淋巴细胞中潜在靶基因 mRNAs 的差异表达

Figure 2 Differentially expressed mRNAs of potential target genes in blood lymphocytes between children with MPP and healthy children

3 讨论

目前认为 MPP 是病原体直接侵犯和免疫损伤二者共同作用的结果。研究提示 *Mp* 对宿主呼吸道黏膜上皮细胞的黏附及定植是导致临床症状发生的首要前提。*Mp* 能够牢固地黏附并侵入上皮细胞内,使 *Mp* 逃避机体的免疫机制或药物作用,并可在呼吸道持续存在数月,使患者成为慢性感染者或无症状携带者^[2]。有研究显示,在 LPS 诱导的小鼠急性肺损伤模型中多个 miRNA 在肺中的表达被动态地调节,其中上调 miR-16 的表达可抑制肺部炎症反应^[3],miR-150 在肺部表达明显下调,可能通过靶标白介素-1 受体相关激酶 2(IRAK2)调节炎症反应^[4]。在 MPP 发病机制中免疫炎症机制同样占有重要作用,其中,MPP 存在细胞免疫失调,主要表现为总 T 细胞降低,T 细胞活化障碍。目前有研究表明,miRNA 通过调节免疫细胞发育和分化功能参与疾病的发生发展。小鼠体内过表达 miR-181a 能够促进 B 淋巴细胞分化,同时使循环中的 T 淋巴细胞减少^[5]。miR-181a、miR-146a 和 miR-146b 可以促进 T 细胞向

Th2 细胞转化,导致促炎反应,而使用激素可通过下调 miR-146a 表达来抑制炎症反应的发生^[6]。在小鼠模型中 miR-181a 过表达后,分化的 B 淋巴细胞数目较正常对照组升高 2 倍,而 T 淋巴细胞数目没有明显改变^[7]。miR-155 能够参与调节 T 辅助细胞的分化和介导 T 细胞参与免疫反应。在单核细胞中 miR-155 对由病毒和细菌激活的(TLR)信号转导通路进行免疫应答,通过下调 MyD88(TLR 信号通路中关键胞浆接头蛋白)降低炎症反应^[8]。通过 TLR 受体的激活诱导 miR-148 与 miR-152 的表达将抑制多种炎症介质的产生,从而减轻炎症反应^[9]。

本实验 miRNA 芯片结果表明 *Mp* 感染引起患儿血液淋巴细胞中 miRNAs 的表达谱改变,选取表达差异显著的 miR-20a-3p、miR-100-5p、miR-93-5p 以及 let-7b-5p 进行后续 RT-PCR 的验证,实验结果与芯片结果一致。因此推测 *Mp* 感染后,可能通过调节干预靶 miRNA 的表达促进肺损伤的发生发展。

在呼吸道疾病中,近期研究发现 miR20a 可以作为非小细胞肺癌早期的诊断标记物,并参与负性调节 T17 淋巴细胞分化^[10-11]。本实验中,验证 miR-20a 可能的靶基因 Bcl-2 mRNA 表达相对上升。Bcl-2 家族在细胞凋亡过程中起着至关重要的作用,包括抗凋亡蛋白成员和促凋亡蛋白成员,其中 Bcl-2 是重要的成员之一^[12],研究表明 Bcl-2 在慢性阻塞性肺病 (chronic obstructive pulmonary diseases, COPD)中可以通过 Fas/FasL 参与 CD4⁺细胞凋亡^[13]。因而推测 MPP 中 miR-20a 可能通过 Bcl-2 参与淋巴细胞的凋亡。现有研究表明 miR-100 在宫颈癌、鼻咽癌、卵巢癌、急性髓细胞白血病等恶性肿瘤中低表达,通过抑制 PLK1 等靶基因表达起到抑癌作用^[14],但在呼吸道炎症疾病中鲜有报道。其主要涉及基因沉默、染色质沉默、负性调节细胞的生物合成等生物学过程。我们验证的潜在靶基因 IGF-1R mRNA 在肺炎组外周血淋巴细胞中表达降低,而位于细胞膜上的 IGF-1R 可以通过结合对应配体胰岛素样生长因子(IGF)进行细胞炎症因子释放等促炎行为,同时 IGF1/IGF-1R 表达升高参与抑制淋巴细胞凋亡^[15],因而推测在 MPP 中 miR-100 可能通过抑制 IGF-1R 表达从而促进淋巴细胞凋亡。miRNA-93 在衰老、高血糖、成骨细胞钙化方面具有重要作用,同时还参与了肝癌、结肠直肠癌、前列腺癌、卵巢癌、喉鳞癌等多种肿瘤的发生、发展和耐药过程^[16]。本实验中验证 miR-93 可能的靶基因 PTEN mRNA 表达下降。已有实验证明抑制巨噬细胞中

PTEN 表达可导致大量炎症介质释放^[17],而抑制肥大细胞 PTEN 表达则可促进其分泌炎症因子^[18],因而本文推测,miR-93 有可能抑制 PTEN 表达从而促进炎症反应。非编码小 RNA let-7b 参与负性调节肿瘤局部炎症,在慢性血栓栓塞性肺高压中也可通过调节 TGFβR1 表达,参与肺血管重建^[19]。TGFβR1 的配体 TGFβ 可以参与多器官组织纤维化,Aurora 等^[20]在实验中发现体内 B 细胞缺乏的小鼠在长期感染 *Mp* 后,病理组织学显示其呼吸道内血管、淋巴管和上皮细胞增生重建比正常小鼠感染明显减少。而在本实验中,TGFβR1 mRNA 表达下降,因而推测 *Mp* 感染后呼吸道内血管及上皮细胞增生重建减少可能与 let-7a 抑制 TGFβR1 相关。

本研究以 miRNAs 为切入点,展开“*Mp* 感染、miRNAs 变化”的作用模式,并寻找 miRNA 潜在作用靶基因,为后期的免疫调控机制研究提供目的基因,更为利用 miRNAs 靶向干预或治疗炎症相关分子导致的损伤及清除 *Mp* 提供新思路。

[参考文献]

- [1] Bartel DP. MicroRNAs:target recognition and regulatory functions[J]. Cell,2009,136(2):215-233
- [2] Yavlovich A,Tarshis M,Rottem S. Internalization and intracellular survival of Mycoplasma pneumoniae by non-phagocytic cells[J]. FEMS Microbiol Lett,2004,233(2):241-246
- [3] 才志刚,张绍明,张 珩,等. LPS 诱发急性肺损伤中 miR-16 的表达及功能研究[J]. 南昌大学学报(医学版),2011,51(2):1-5
- [4] Schmidt WM,Spiel AO,Jilma B,et al. In vivo profile of the human leukocyte microRNA response to endotoxemia [J]. Biochem Biophys Res Commun,2009,380(3):437-441
- [5] Shivdasani RA. MicroRNAs:regulators of gene expression and cell differentiation[J]. Blood,2006,108(12):3646-3653
- [6] Feng MJ,Shi F,Qiu C,et al. MicroRNA-181a,-146a and -146b in spleen CD4⁺ T lymphocytes play proinflammatory roles in a murine model of asthma[J]. Int Immunopharmacol,2012,13(3):347-353
- [7] Chen CZ,Li L,Lodish HF,et al. MicroRNAs modulate hematopoietic lineage differentiation[J]. Science,2004,303(5654):83-86
- [8] Ceppi M,Pereira PM,Dunand-Sauthier I,et al. MicroRNA-155 modulates the interleukin-1 signaling pathway in activated human monocyte-derived dendritic cells [J]. Proc Natl Acad Sci USA,2009,106(8):2735-2740
- [9] Liu X,Zhan Z,Xu L,et al. MicroRNA-148/152 impair

innate response and antigen presentation of TLR-triggered dendritic cells by targeting CaMK II alpha[J]. *J Immunol*, 2010,185(12):7244-7251

[10] Fan L, Qi H, Teng J, et al. Identification of serum miRNAs by nano-quantum dots microarray as diagnostic biomarkers for early detection of non-small cell lung cancer [J]. *Tumour Biol*, 2016,37(6):7777-7784

[11] Honardoost MA, Naghavian R, Ahmadinejad F, et al. Integrative computational mRNA-miRNA interaction analyses of the autoimmune-deregulated miRNAs and well-known Th17 differentiation regulators; An attempt to discover new potential miRNAs involved in Th17 differentiation [J]. *Gene*, 2015, 572(2): 153-162

[12] 史新惠, 潘世扬, 黄珮琚, 等. 单抗 NJ001 杀伤肺腺癌细胞机制的初步研究[J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2014, 34(7): 858-862

[13] 卓宋明, 徐文莉, 梁珊瑚, 等. 慢性阻塞性肺病患者 T 淋巴细胞亚群凋亡与 Fas, FasL, Bcl-2 表达的关系[J]. *中华临床医师杂志(电子版)*, 2011, 5(6): 1554-1560

[14] 付海龙, 徐广峰, 史春梅, 等. hsa-miR-100 的生物信息学分析[J]. *国际检验医学杂志*, 2012, 33(18): 2177-2180

[15] Weigent DA, Arnold RE. Expression of insulin-like growth factor-1 and insulin-like growth factor-1 receptors in EL4 lymphoma cells overexpressing growth hormone[J]. *Cell Immunol*, 2005, 234(1): 54-66

[16] 刘 更, 周鸿鹰. miR-93 与肿瘤的研究进展[J]. *四川解剖学杂志*, 2013, 28(3): 28-31

[17] Lin CF, Young KC, Bai CH, et al. Blockade of reactive oxygen species and Akt activation is critical for anti-inflammation and growth inhibition of metformin in phosphatase and tensin homolog-deficient RAW264. 7 cells [J]. *Immunopharmacol Immunotoxicol*, 2013, 35(6): 669-677

[18] Zhou Y, Yang Q, Xu H, et al. miRNA-221-3p enhances the secretion of interleukin-4 in mast cells through the phosphatase and tensin homolog/p38/nuclear factor-kappaB pathway[J]. *PLoS One*, 2016, 11(2): e148821

[19] Guo L, Yang Y, Liu J, et al. Differentially expressed plasma microRNAs and the potential regulatory function of Let-7b in chronic thromboembolic pulmonary hypertension[J]. *PLoS One*, 2014, 9(6): e101055

[20] Aurora AB, Baluk P, Zhang D, et al. Immune complex-dependent remodeling of the airway vasculature in response to a chronic bacterial infection[J]. *J Immunol*, 2005, 175(10): 6319-6326

[收稿日期] 2016-05-17

(上接第 587 页)

2015, 220(11): 1284-1291

[3] Bălănescu P, Lădaru A, Bălănescu E, et al. IL-17, IL-6 and IFN- γ in systemic sclerosis patients[J]. *Rom J Intern Med*, 2015, 53(1): 44-49

[4] Thakur C, Wolfarth M, Sun J, et al. Oncoprotein mdig contributes to silica-induced pulmonary fibrosis by altering balance between Th17 and Treg T cells [J]. *Oncotarget*, 2015, 6(6): 3722-3736

[5] 董昭兴, 邵文琳, 雷 雯, 等. IL-17A 在博来霉素致小鼠肺纤维化形成中的表达[J]. *西安交通大学学报(医学版)*, 2012, 33(2): 199-202

[6] Szapiel SV, Elson NA, Fulmer JD, et al. Bleomycin-induced interstitial pulmonary disease in the nude, athymic mouse[J]. *Am Rev Respir Dis*, 1979, 120(4): 893-899

[7] Hagimoto N, Kuwano K, Kawasaki M, et al. Induction of apoptosis and pulmonary fibrosis in mice in response to ligation of Fas antigen[J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 1999, 21(3): 436-445

[8] 张效云, 李 琦, 张颖骞. 中和白细胞介素-17 加重小鼠衣原体呼吸道感染[J]. *北京大学学报(医学版)*, 2013, 45(4): 613-618

[9] 程 溪, 王沙沙, 刘宇宏, 等. IL-17A 对硝普钠诱导的类风湿关节炎成纤维样滑膜细胞凋亡的保护作用及机制研究[J]. *中国免疫学杂志*, 2013, 29(12): 1276-1280

[10] Zhang XY, Gao LF, Lei L, et al. A MyD88-dependent early IL-17 production protects mice against airway infection with the obligate intracellular pathogen *Chlamydia muridarum* [J]. *J. Immunol*, 2009, 183(2): 1291-1300

[11] Winters CJ, Koval O, Murthy S, et al. CaMK II inhibition in type II pneumocytes protects from bleomycin-induced pulmonary fibrosis by preventing Ca²⁺-dependent apoptosis[J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2016, 310(1): L86-94

[收稿日期] 2016-10-27