·基础医学·

QPRT基因功能缺失对肾脏发育的影响

李晨星,周晓燕,张慕玲*

南京医科大学附属淮安第一医院产前诊断中心,江苏 淮安 223300

[摘 要] **目的**:研究喹啉磷酸核糖基转移酶(quinolinic phosphoribosyl transferase,QPRT)基因功能缺失对胚胎肾脏发育的影响。**方法**:通过免疫组化确定QPRT在胎鼠肾脏组织的表达;构建QPRT基因缺陷型小鼠模型,取$QPRT^{+/+}$(WT)型和$QPRT^{-/-}$(KO)型小鼠的血清进行肾功能检测;称重法计算KO及WT组小鼠的体重、肾脏重量及肾脏系数;用HE染色观察小鼠及其子代肾脏病理组织学变化。**结果**:在妊娠13 d胎鼠肾脏组织,QPRT在发育中的输尿管芽中强烈表达。在基因敲除小鼠模型中,$QPRT^{-/-}$小鼠的肾脏系数(肾重/体重)显著低于野生型小鼠($P<0.05$),且$QPRT^{-/-}$小鼠的尿素氮、血肌酐、尿酸水平高于野生型组($P<0.05$)。肾脏组织HE染色显示$QPRT^{-/-}$仔鼠的肾脏实质部位局部呈现蜂窝状囊性扩张;$QPRT^{+/-}$仔鼠见肾脏皮质间质局灶性疏松水肿;$QPRT^{+/+}$仔鼠肾脏未见明显病理组织学变化。**结论**:QPRT基因功能缺失可能影响胚胎肾脏发育。

[关键词] 先天性肾畸形;基因敲除;喹啉磷酸核糖转移酶

[中图分类号] R392.69 [文献标志码] A [文章编号] 1007-4368(2023)02-207-06

doi:10.7655/NYDXBNS20230208

Effects of QPRT gene loss-of-function on renal development

LI Chenxing,ZHOU Xiaoyan,ZHANG Muling*

Department of Prenatal Diagnosis Center, the Affiliated Huaian No.1 People's Hospital of Nanjing Medical University, Huai'an 223000, China

[**Abstract**] **Objective**: To study the effect of functional deletion of quinoline phosphoribosyltransferase (QPRT) gene on fetal kidney development. **Methods**: The expression of QPRT in fetal mouse kidney tissue was located by immunohistochemistry. The QPRT gene-deficient mouse model was constructed, and the serum of $QPRT^{+/+}$ (WT) and $QPRT^{-/-}$ (KO) mice were collected for renal function detection. The body weight, kidney weight and kidney coefficient of KO and WT mice were calculated by weighing method, and the histopathological changes of kidney of mice and their offspring were observed by HE staining. **Results**: QPRT was strongly expressed in developing ureteral buds in fetal mouse kidney at 13 days of gestation. The kidney coefficient (kidney weight/body weight) of $QPRT^{-/-}$ mice was significantly lower than that of wild-type mice, and the levels of urea nitrogen, serum creatinine and uric acid of $QPRT^{-/-}$ mice were higher than those of wild-type mice ($P<0.05$). HE staining of kidney tissue showed cellular cystic dilatation in renal parenchyma of $QPRT^{-/-}$ offspring mice, $QPRT^{+/-}$ mice showed focal loose edema of renal cortex and interstitium; $QPRT^{+/+}$ mice showed no obvious histopathological changes in the kidneys. **Conclusion**: The loss of QPRT gene function may affect fetal kidney development.

[**Key words**] congenital renal malformation; gene knockout; quinoline phosphoribosyl transferase gene

[J Nanjing Med Univ, 2023, 43(02): 207-212]

胎儿肾脏发育不良(renal hypodysplasia,RHD)是临床常见的胎儿泌尿系统畸形(congenital anomalies of the kidney and urinary tract,CAKUT),在活产儿中的发病率为3‰~7‰,约占儿童慢性肾病和肾衰竭病因的70%[1],严重影响患儿远期生活质量。其表型主要有3类:①肾脏缺如,由胚胎期肾脏发育未正常启动所致;②肾脏发育异常,肾脏含有未完

[基金项目] 南京医科大学科技发展基金(NMUB2019354);吴阶平医学基金会临床科研专项资助基金(320.6755.15016);淮安市自然科学研究计划基金(HAB202108)

*通信作者(Corresponding author),E-mail:13915117886@163.com

全成熟化的组织，如囊性病变；③肾脏发育不全，肾脏含有较少的肾单位和/或肾脏体积缩小[2]。

RHD致病机制复杂，涉及多种基因突变或者信号通路异常[3-4]。目前，约40个CAKUT致病基因已被确定，解释了5%~20%的患者病因[5]。另外大约16%的病例被确定为基因拷贝数变异导致，其中研究比较多的是17号染色体上的HNFB1基因座与22号染色体上的Di-George综合征区域[6]。16p11.2基因座是CAKUT研究热点区域，与全面发育迟缓、畸形、癫痫等相关，部分患者表现出肾脏畸形或其他肾脏疾病[7]。该区域的喹啉磷酸核糖基转移酶（quinolinic phosphoribosyl transferase，QPRT）基因在肾脏组织中的表达最高，但其对胎儿肾脏发育的影响尚不明确。

本研究利用免疫组化在胎鼠肾脏组织中对QPRT基因定位，并进一步构建了QPRT基因敲除小鼠模型，观察小鼠及其子代肾脏病理组织学及肾功能变化，探讨QPRT基因缺陷对肾脏发育的影响，为挖掘RHD新致病基因提供新证据。

1 材料和方法

1.1 材料

实验采用的动物均为C57BL/6JGpt品系背景，QPRT基因敲除的F0代小鼠购自南京大学南京生物医药研究所，于淮安市第一人民医院无特定病原体（specific pathogen free，SPF）级环境中饲养及配繁，动物饲养环境严格保证温度为18~22 ℃、相对湿度为40%~70%且明暗交替时间12 h/12 h（07:00-19:00），喂养灭菌水和SPF级繁殖鼠料，自由进食水。取E13胎鼠肾脏组织，用免疫组织化学（immunohistochemistry，IHC）检测QPRT基因在肾脏中的表达。本研究经南京医科大学实验动物福利伦理委员会批准[批准文号：南医大伦审（YX-2-2022-021-01号]，所有实验动物的操作与饲养均符合国标及江苏省实验动物中心管理饲养条例，符合伦理规范要求。

QPRT引物由南京大学南京生物医药研究所设计，引物及琼脂糖粉末购自生工生物工程（上海）股份有限公司，QPRT引物序列如表1。正义5′-GAAGGGCAAACCATTAAGAGAAGC-3′，反义5′-GCAGTAACAGCAATCCTGTGGAAG-3′，引物长度24 bp，产物长度256 bp，退火温度65 ℃。

1.2 方法

1.2.1 QPRT在胎鼠肾脏组织的表达

取E13胎鼠肾脏组织，用4%多聚甲醛过夜固定，取出冲洗后脱水，组织包埋切片，对石蜡切片进行免疫组化。载玻片用二甲苯脱蜡，然后在乙醇中连续脱水，蒸馏水浸洗。在0.1 mol/L柠檬酸修复液（pH6）中，中高火加热玻片30 min进行抗原修复。在3% H_2O_2中室温避光孵育10 min，阻断内源性过氧化物酶活性，PBS（pH7.4）浸洗3次，每次5 min。将载玻片封闭在3% BSA溶液中，置于湿盒中室温孵育30 min。而后甩掉封闭液，滴加一抗工作液均匀覆盖组织，使载玻片在一抗中4℃孵育过夜。第2天取出切片室温复温30 min，润洗后，滴加与一抗对应的即用型快捷免疫组化MaxVision™HRP二抗覆盖组织，在室温下持续30 min。再次润洗，用DAB过氧化物酶底物试剂盒进行显色，苏木素复染。连续脱水待干后，中性树脂封片。

1.2.2 基因敲除小鼠模型建立及表型鉴定

CRISPR/Cas9技术构建QPRT基因敲除小鼠模型：由南京大学模式动物研究所订购QPRT Cas9-KO斑点鼠（-4 321 bp/wt，E2-E4完全删除，KO阳性，5.43周龄），得到嵌合体F0代小鼠。

QPRT基因敲除小鼠的饲养和繁殖：将F0代中所有小鼠饲养于SPF级环境中，提供充足的食物与可饮用水。通过PCR及TA克隆测序分析，从所有的F0代小鼠中挑选出QPRT基因缺失的小鼠，然后将性成熟的阳性F0代小鼠（满8周）分别与同龄的C57BL/6J小鼠交配，培育后成功获得F1代小鼠，继续将F1代小鼠在SPF环境中饲养，再将性成熟的F1代雌雄小鼠相互杂交，杂交后的每只F1代孕鼠单独饲养、培育，得到F2代小鼠。

基因型鉴定：同一父母产生的后代小鼠中包含野生型（WT）、杂合型（HT）和基因敲除型（KO）3种基因型。采用剪脚趾法标记小鼠，并剪取鼠尾组织经酚氯仿法提取DNA，依据表格1中在靶区域设计的引物进行扩增，于1.5%琼脂糖凝胶上加入PCR扩增产物5 μL，DNA Marker 3 μL，电泳30 min后通过凝胶成像仪获取条带，凝胶分析系统进行分析。基因型鉴定后筛选出WT型和KO型小鼠。

Western blot检测QPRT蛋白表达：处死小鼠后取肾脏组织，加入蛋白裂解液提取蛋白。蛋白定量后，加入5×上样缓冲液配成样品，90 ℃水浴10 min使蛋白变性，通过聚丙烯酰胺凝胶电泳后，转膜至PVDF膜上，用5%脱脂奶粉溶液封闭2 h，加入相应的一抗，4 ℃过夜孵育，加入对应的二抗，室温孵2 h，ECL发光显色，成像分析。

称重法、肾功能检测、HE染色实验方法：初步分

析已获得的QPRT敲除小鼠的表型，以出生后第8周QPRT$^{-/-}$(KO组)小鼠为实验组，同周龄QPRT$^{+/+}$(WT组)小鼠作为对照组，处死小鼠后取出肾脏组织。称重法检测各组小鼠的体重与肾脏重量，评估肾脏系数(肾重/体重比)结果是否具有统计学差异。使用全自动生化分析仪测量小鼠血清肌酐、尿素氮、尿总蛋白，计算内生肌酐清除率。分离E11.5 WT型胎鼠和KO型胎鼠的肾脏、脾脏、肺部、心脏及肝脏，4%多聚甲醛固定后进行常规石蜡包埋、切片，通过苏木精-伊红(hematoxylin-eosin，HE)染色评估组织病理学变化。

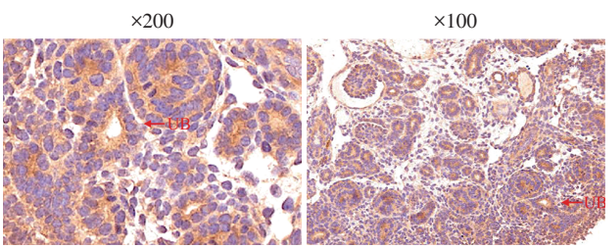
1.3 统计学方法

计量资料采用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示，两组间比较采用t检验。所有分析均采用SPSS 22.0软件，双侧检验，$P < 0.05$为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 QPRT在胎鼠肾脏组织的表达

显微镜拍照如下图。发现QPRT在E13天胎鼠肾脏组织的输尿管芽(ureteric bud，UB)表达(图1)。



E13 d胎鼠肾脏组织UB(红色箭头)。

图1 QPRT在胎鼠肾脏的输尿管芽中表达

Figure 1 Expression of QPRT in ureteril bud of fetal mouse kidney

2.2 QPRT基因敲除小鼠基因型鉴定

对F2代小鼠提取鼠尾DNA进行PCR扩增，电泳结果如图2示，出现1条256 bp左右条带的为QPRT$^{-/-}$(KO组)小鼠；只出现1条408 bp左右的条带的为QPRT$^{+/+}$(WT组)小鼠。

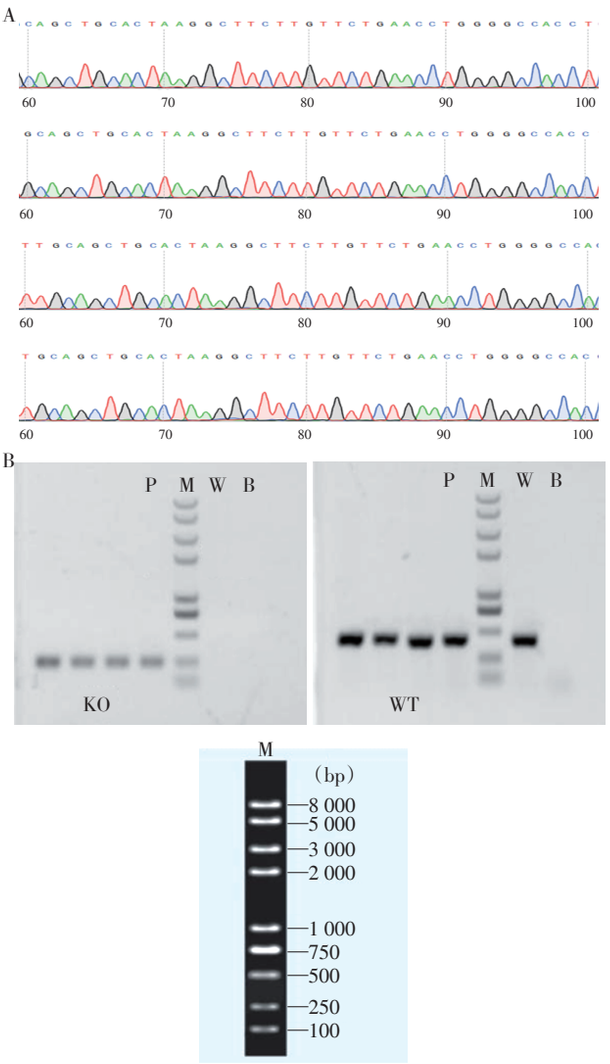
2.3 基因敲除小鼠肾脏组织中QPRT蛋白表达情况

Western blot结果表明，QPRT$^{-/-}$小鼠肾脏组织中QPRT蛋白基本不表达，而QPRT$^{+/+}$小鼠肾脏组织中的QPRT表达水平较高，杂合子的表达水平介于两者之间(图3)，GAPDH为内参蛋白。

2.4 QPRT基因敲除小鼠表型鉴定

2.4.1 QPRT$^{-/-}$与QPRT$^{+/+}$小鼠的体重、肾脏重量及肾脏系数分析

以出生后第8周QPRT$^{-/-}$小鼠为实验组，同周龄



A：F0小鼠基因测序结果；B：PCR鉴定KO型和WT型小鼠。P：阳性对照；M：DNA Ladder；W：野生型对照；B：空白对照(ddH_2O)。

图2 小鼠PCR基因型鉴定

Figure 2 PCR genotyping of the QPRT WT and KO mice

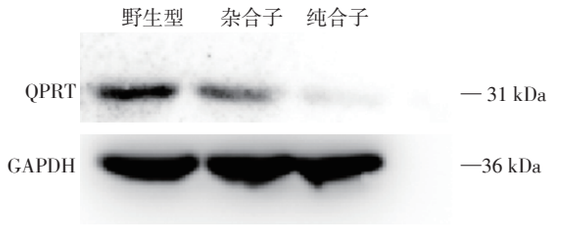


图3 Western blot法检测QPRT蛋白在野生型、杂合子、纯合子小鼠肾脏组织中的表达

Figure 3 Detection of QPRT protein expression in the wild type, heterozygote and homozygote mouse kidney tissues by Western blot

QPRT$^{+/+}$小鼠作为对照组。

雌性组(KO组n=8，WT组n=8)：在小鼠体重上，KO组平均值19.32 g小于WT组平均值19.95 g($P <$

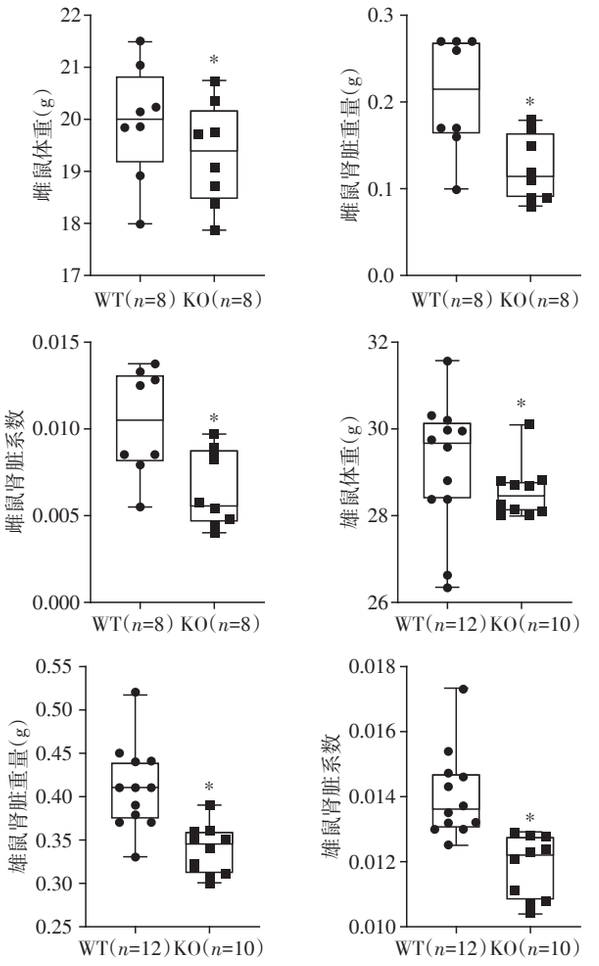
0.05，图4A）；在肾脏重量上，KO组平均值0.12 g小于WT组平均值0.21 g（$P<0.05$，图4B）；在肾脏系数上，KO组平均值0.006小于WT组平均值0.010（$P<0.05$，图4C）。雄性组（KO组n=10，WT组n=12）：在小鼠体重上，KO组平均值28.56 g小于WT组平均值29.15 g（$P<0.05$，图4D）；在肾脏重量上，KO组平均值0.34 g小于WT组平均值0.41 g（$P<0.05$，图4E）；在肾脏系数上，KO组平均值0.012小于WT组平均值0.014（$P<0.05$，图4F）。

2.4.2 $QPRT^{-/-}$与$QPRT^{+/+}$小鼠的肾功能分析

对各组小鼠进行肾功能检测发现，KO组与WT组相比，KO组URE、CRE-S、Glu、URIC和β2-MG的含量均显著升高（$P<0.05$，图5），KO小鼠的血清检测中尿素氮、血肌酐、尿酸水平高于WT组（秩和检验：尿素氮$Z=-2.562$，$P<0.05$；肌酐$Z=-2.402$，$P<0.05$；尿酸$Z=-1.992$，$P<0.05$）。

2.4.3 $QPRT^{-/-}$仔鼠病理组织学分析

雌性$QPRT^{+/-}$小鼠与$QPRT^{+/-}$雄性交配，因小鼠肾脏在出生2周后发育结束，所以在此时处死仔鼠，收集肾脏、脾脏、肺部、心脏及肝脏，进行HE染色。肾脏组织HE染色显示$QPRT^{-/-}$仔鼠的肾脏实质部位局部呈现蜂窝状囊性扩张（图6A、B）。$QPRT^{+/-}$仔鼠病变较轻，见肾脏皮质间质局灶性疏松水肿（图6C），肾脏部分区域近曲小管上皮细胞胞质空泡样变性（图6D）；$QPRT^{+/+}$仔鼠肾脏未见明显病理组织学变化（图6E、F）。$QPRT^{-/-}$与$QPRT^{+/-}$仔鼠的其余脏器（脾脏、肺部、心脏及肝脏）未见明显病理组织学变化。



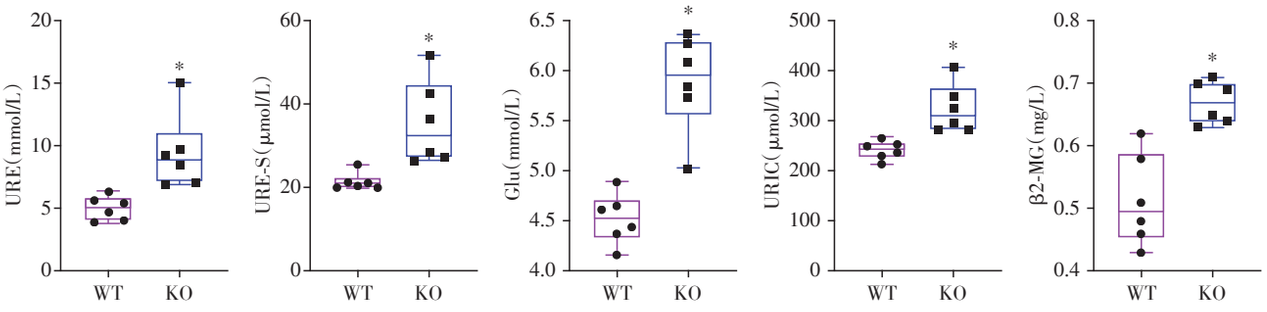
与WT组比较，*$P<0.05$。

图4 雄性组及雌性组小鼠的体重、肾脏重量及肾脏系数（肾重/体重比）结果

Figure 4 Results of body weight, kidney weight and kidney coefficient (kidney weight / body weight ratio) of male and female mice

3 讨 论

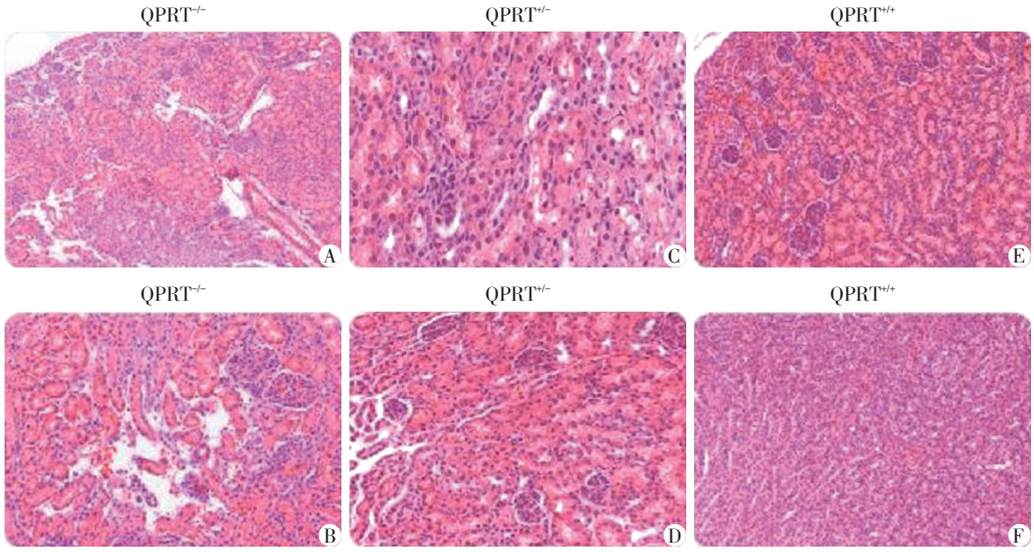
QPRT基因位于16p11.2（NC_000016.10）区域，主要在人和小鼠的肾脏和肝脏中特异性表达。在成熟肾脏中，QPRT蛋白主要分布在新陈代谢最活跃的近端小管上皮细胞中。研究提示，QPRT基因纯合缺失是自闭症发病原因之一[8]，QPRT也是急性髓性白血病的直接靶基因，亦可以加重神经胶质瘤的恶化程度[8]。但是目前尚无报道QPRT与胚胎肾



与WT组比较，*$P<0.05$。

图5 KO组与WT组肾功能参数比较结果

Figure 5 Comparison of renal function parameters between KO group and WT group



A(×100)、B(×200)：QPRT$^{-/-}$仔鼠的肾脏实质部位；C(×200)、D(×200)：QPRT$^{+/-}$仔鼠的肾脏实质部位；E(×200)：QPRT$^{+/+}$仔鼠肾实质；F(×100)：QPRT$^{+/+}$仔鼠肾髓质。

图6　仔鼠肾脏显微镜下肾脏实质部位

Figure 6　Microscopic examination of renal parenchyma in offspring

脏发育的关系。

前期研究发现QPRT在胎鼠早期发育中的UB中明显表达，该定位提示了QPRT基因可能在胚胎肾脏发育中发挥功能。哺乳动物的肾脏起源于后肾，形成于人类胚胎第5周，相当于小鼠胚胎第11天。后肾的发育依赖于UB和后肾间充质(metanephric mesenchyme，MM)之间的一系列相互诱导、相互作用[9]。UB入侵MM并分枝，最终分化成为集合管、肾盂和输尿管。UB又向MM传递信息，使其发育成为肾单位和肾间质[10]。研究表明这些复杂发育过程通过大量基因及信号传导通路进行调控。如已知的GDNF/Ret通路、Wnt以及NOTCH途径等；原癌基因RET、WNT11在UB特异性表达，GDNF、WT1和EYA1在MM表达，这些关键步骤中的基因和转录因子的变异可导致RHD的发生[11]。基于前期研究提示QPRT在UB表达，本研究推测QPRT功能缺失可能干扰UB与MM相互作用从而导致肾脏畸形的发生。

CRISPR/Cas9技术是目前发展迅速并广泛应用的基因编辑技术[12]，本研究使用CRISPR/Cas9技术构建了QPRT缺陷型小鼠，发现QPRT基因敲除后小鼠的肌酐、尿素氮等肾功能指标升高，提示小鼠肾功能受损。QPRT是NAD$^+$从头合成途径的限速酶，来自实验模型和临床研究的数据揭示NAD$^+$稳态是肾脏健康和肾小管抵抗各种应激源能力的决定因素[13]。有研究通过小鼠局部肾损伤模型结合代谢组学分析筛选出了与急性肾损伤(acute kidney injury，AKI)相关的代谢变化，发现此时肾脏的NAD$^+$下降，喹啉酸上升，QPRT下降。随后研究者又采用了基因编辑的办法获得了QPRT$^{+/-}$小鼠，以模仿QPRT下降这一获得性缺陷，发现QPRT的下降导致了肾脏中NAD$^+$的下降，并且升高了尿中的喹啉酸盐，加剧了小鼠对AKI的敏感性[13]。此外，亦有研究表明中成药健脾益肾方能够通过上调QPRT/NAD$^+$/SIRT3通路的蛋白表达，有效缓解慢性肾脏疾病进展[14]。以上结果表明QPRT可以保护肾脏的NAD$^+$，并介导机体对AKI的抵抗力。

已有大量关于基因剂量改变引起复杂的涉及肾脏和肾外表型的研究，如由PAX2突变引起的肾发育不全的肾缺损综合征。动物模型显示，PAX2纯合子突变模型小鼠双侧肾缺如；杂合子突变小鼠肾脏表型为发育不全；PAX2过量表达时则形成多囊肾[15]。MAZ基因亦是调控生殖泌尿系统发育的剂量敏感性基因。MAZ的纯合缺失导致65.5%的CAKUT发病率，野生型及杂合型的CAKUT外显率低于6%[16]。本研究结果显示野生型、杂合型和纯合型小鼠的QPRT基因表达呈递减趋势；KO小鼠的肾脏系数(肾重/体重比)显著降低，这提示QPRT敲除后小鼠的肾单位数量减少，其子代QPRT纯合子突变模型小鼠呈双侧肾脏多囊性发育不良，杂合子突变小鼠肾脏轻度多囊性改变，这有力地证明了QPRT基因对小鼠肾脏发育的影响具有基因剂量效

应。最近的研究表明，NAD^+合成途径关键基因的突变可导致先天性畸形，包括编码色氨酸转运蛋白的基因、编码Kynurenine通路酶的基因（NMNAT1-3和NADSYN1）[17]。另外亦有研究表明QPRT拷贝数缺失并外源性烟酸缺乏的小鼠血液NAD^+浓度明显降低[18]。基于QPRT参与NAD^+合成，推测小鼠模型表现的肾脏病理组织学表型可能与其过低的NAD^+浓度相关，这亦为我们研究QPRT影响肾脏发育的机制提供了方向。

综上所述，本研究从QPRT基因敲除的成年小鼠与胎鼠的肾脏等组织水平研究QPRT基因对胚胎肾脏发育的致病作用，预测QPRT基因可能为RHD的潜在致病基因。本研究的不足之处在于未能探索QPRT在肾脏发育中的具体调控机制。但是QPRT基因是NAD^+合成途径的关键酶基因，这亦为从代谢角度深入研究RHD的致病机制提供了依据，并有望为后续的临床诊断及靶向治疗提供新线索。

[参考文献]

[1] KNOERS N V A M. The term CAKUT has outlived its usefulness: the case for the defense [J]. Pediatr Nephrol, 2022, 37(11): 2793-2798

[2] ELMORE S A, KAVARI S L, HOENERHOFF M J, et al. Histology atlas of the developing mouse urinary system with emphasis on prenatal days E10.5-E18.5 [J]. Toxicol Pathol, 2019, 47(7): 865-886

[3] SHORT K M, SMYTH I M. Branching morphogenesis as a driver of renal development [J]. Anat Rec (Hoboken), 2020, 303(10): 2578-2587

[4] PACKARD A, KLEIN W H, COSTANTINI F. Ret signaling in ureteric bud epithelial cells controls cell movements, cell clustering and bud formation [J]. Development, 2021, 148(9): dev199386

[5] WESTLAND R, VERBITSKY M, VUKOJEVIC K, et al. Copy number variation analysis identifies novel CAKUT candidate genes in children with a solitary functioning kidney [J]. Kidney international, 2015, 88(6): 1402-1410

[6] CHAI O H, SONG C H, PARK S K, et al. Molecular regulation of kidney development [J]. Anat Cell Boil, 2013, 46(1): 19-31

[7] ERBAY M F, KARAYAĞMURLU A. Two siblings with autism spectrum disorder and two different genetic abnormalities: paternal 16p11.2 microdeletion and maternal 17q12 microduplication [J]. Psychiatr Genet, 2021, 31(6): 246-249

[8] ULLMARK T, MONTANO G, JÄRVSTRÅT L, et al. Anti-apoptotic quinolinate phosphoribosyltransferase (QPRT) is a target gene of Wilms' tumor gene 1 (WT1) protein in leukemic cells [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2017, 482(4): 802-807

[9] CHAN K, LI X. Current epigenetic insights in kidney development [J]. Genes (Basel), 2021, 12(8): 1281

[10] 刘曼菱，赵丽华，张曼玲，等. 胎猪肾脏发育不同时期相关信号分子的表达 [J]. 南京医科大学学报（自然科学版），2019，39(6)：822-828

[11] ISHIDOH K, KAMEMURA N, IMAGAWA T, et al. Quinolinate phosphoribosyl transferase, a key enzyme in de novo NAD(+) synthesis, suppresses spontaneous cell death by inhibiting overproduction of active-caspase-3 [J]. Biochim Biophys Acta, 2010, 1803(5): 527-533

[12] 朱浩然，张　鑫，祁俊侠，等. 利用双引导RNA的CRISPR/Cas9技术构建Nudt3基因敲除小鼠 [J]. 南京医科大学学报（自然科学版），2021，41(7)：949-955

[13] POYAN MEHR A, TRAN M T, RALTO K M, et al. De novo NAD+ biosynthetic impairment in acute kidney injury in humans [J]. Nat Med, 2018, 24(9): 1351-1359

[14] LIU X, LIU S, ZHANG B, et al. Jian-Pi-Yi-Shen formula alleviates chronic kidney disease in two rat models by modulating QPRT/NAD^+/SIRT3/Mitochondrial dynamics pathway [J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2021, 2021: 6625345

[15] HARSHMAN L A, BROPHY P D. PAX2 in human kidney malformations and disease [J]. Pediatr Nephrol, 2012, 27(8): 1265-1275

[16] HALLER M, AU J, O'NEILL M, et al. 16p11.2 transcription factor MAZ is a dosage-sensitive regulator of genitourinary development [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2018, 115(8): E1849-E1858

[17] SHI H, ENRIQUEZ A, RAPADAS M, et al. NAD Deficiency, congenital malformations, and niacin supplementation [J]. N Engl J Med, 2017, 377(6): 544-552

[18] SHIBATA K, FUKUWATARI T. Organ correlation with tryptophan metabolism obtained by analyses of TDO-KO and QPRT-KO mice [J]. Int J Tryptophan Res, 2016, 9: 1-7

[收稿日期] 2022-08-27

（本文编辑：唐　震）