

Piwi2调控宫颈癌细胞恶性生物学行为的机制探讨

冯定庆, 闫克芹, 张 筱, 邓 琳, 凌 斌

中日友好医院妇产科, 北京 100029

[摘要] 背景与目的: Piwi2在肿瘤干细胞及癌前干细胞中高表达, 通过转录和转录后调控机制调控多种基因表达, 与肿瘤发生、发展密切相关。该研究探讨Piwi2与宫颈癌细胞恶性生物学行为之间的关系及可能的调控机制。方法: 构建慢病毒载体pLenti-CMV-Piwi2-SV40-EGFP和shPiwi2质粒, 分别转染HeLa和SiHa细胞, 建立过表达/沉默Piwi2表达稳转细胞株, 反转录聚合酶链反应(reverse transcription polymerase chain reaction, RT-PCR)及蛋白[质]印迹法(Western blot)鉴定转染效果; 采用CCK-8法检测细胞增殖能力; PI染色后, 流式细胞术(fluorescence-activated cell sorting, FACS)检测细胞周期; Western blot检测细胞增殖及周期相关调控蛋白表达; 采用维拉帕米(verapamil)处理细胞, Hoechst 33342染色, FACS检测侧群(side population, SP)细胞比例; CCK-8法检测顺铂对细胞的杀伤活性。结果: 过表达Piwi2上调HeLa和SiHa细胞S期及G₂/M期细胞比例, 进而促进细胞增殖, 与对照组比较差异均有统计学意义($P < 0.05$); 沉默Piwi2表达则细胞发生G₀/G₁期阻滞, 抑制细胞增殖($P < 0.05$); Piwi2上调cyclin D1表达, 提高Stat3磷酸化水平, 下调p53表达; Piwi2显著上调HeLa和SiHa细胞中SP细胞比例($P < 0.01$), 提高宫颈癌细胞对顺铂的耐药性($P < 0.01$); 沉默Piwi2则相反, 显著提高对顺铂的敏感性。结论: Piwi2上调SP细胞比例, 促进宫颈癌进展; Piwi2可作为宫颈癌的潜在治疗靶点。

[关键词] Piwi2; 子宫颈癌; 侧群细胞; 耐药

DOI: 10.19401/j.cnki.1007-3639.2017.12.001

中图分类号: R737.33 文献标志码: A 文章编号: 1007-3639(2017)12-0921-07

The role of Piwi2 in regulating the malignant process of cervical cancer FENG Dingqing, YAN Keqin, ZHANG Xiao, DENG Lin, LING Bin (Department of Obstetrics and Gynecology, China-Japan Friendship Hospital, Beijing 100029, China)

Correspondence to: LING Bin E-mail: lingbin.ling@vip.sina.com

[Abstract] **Background and purpose:** Piwi2 is highly expressed in precancerous and cancer stem cells, which plays a key role in the process of tumorigenesis and progression through the transcriptional and post-transcriptional regulation of gene expression. This study aimed to elucidate the role of Piwi2 in regulating the malignant process of cervical cancer. **Methods:** In order to generate cell line with overexpression or silence of Piwi2, HeLa and SiHa cells were transfected with lentiviral pLenti-CMV-Piwi2-SV40-EGFP or plasmid shPiwi2, respectively. Cell proliferation assays using CCK-8 were performed in 96-well format in duplicate. Cell cycle and side population (SP) cells were analyzed by fluorescence-activated cell sorting (FACS). The proteins related to cell growth and cell cycle were measured by Western blot. CCK-8 assay was also used to assess the killing effects of cisplatin. **Results:** Overexpression of Piwi2 promoted cervical cancer cell proliferation and the entry of cells from G₀/G₁ phase into S phase, as compared to the control cells ($P < 0.05$). On the contrary, Piwi2 knockdown suppressed proliferation of both cells and increased the number of cells during G₀/G₁ phase markedly ($P < 0.05$). Western blot analyses confirmed that Piwi2 overexpression led to an upregulation of cyclin D1 and p-Stat3 but a significantly decreased level of p53. Furthermore, overexpression of Piwi2 significantly increased the SP cell populations in both HeLa and SiHa cells ($P < 0.01$), sequentially enhanced resistance in cancer cells to cisplatin ($P < 0.01$). Instead, Piwi2 gene knockdown induced an apparent downregulation of cyclin D1 and p-Stat3, significantly increased p53 expression, and decreased proportion of SP cells, which, to

some extent, contributed to the improved sensitivity to cisplatin. **Conclusion:** Piwil2 plays an essential role in the progression of cervical cancer via increasing the proportion of SP cells. Therefore, targeting Piwil2 may be an effective therapeutic option for patients with cervical cancer.

[**Key words**] Piwil2; Cervical cancer; Side population cells; Drug resistance

Piwil2属于PIWI/AGO家族, 位于人类第8号染色体, 在胚胎干细胞(embryonic stem cells, ESCs)和生殖干细胞(germline stem cells, GSCs)中广泛表达, 对于干细胞自我更新和分化具有重要的调控作用^[1-2]。出生后的正常个体, Piwil2仅表达于睾丸生精细胞, 其他组织均未见表达, 而在各种肿瘤组织和肿瘤细胞系可见Piwil2重新表达, 被认为是一种新的肿瘤睾丸抗原(cancer-testis antigen, CAT)^[3-5]。我们的前期研究结果显示, 在正常宫颈组织和宫颈上皮内瘤变(cervical intraepithelial neoplasia, CIN)1病变中未见Piwil2, CIN2-3病变及宫颈癌组织中重现Piwil2表达^[2], 并且Piwil2是宫颈癌干细胞一个重要的分子标志^[6]。进一步的研究证实, Piwil2通过表观遗传途径促进转录因子c-myc、nanog、sox2和oct4表达而启动细胞重编程^[2]。然而, Piwil2表达与宫颈癌恶性生物学行为及肿瘤进展之间的关系, 目前尚不清楚。

本研究试图通过在宫颈癌细胞HeLa和SiHa中分别沉默和过表达Piwil2, 观察细胞恶性生物学特性的改变, 并深入探讨其可能的分子机制, 以期进一步完善宫颈癌的发病机制, 并为宫颈癌的治疗寻找新的靶点。

1 材料和方法

1.1 主要试剂

高糖DMEM、RPMI-1640、胎牛血清(fetal calf serum, FCS)、TRIzol试剂盒、LipofectamineTM3000、蛋白酶抑制剂混合物、BCA蛋白定量试剂盒和ECL显色试剂盒均购自美国ThermoFisher公司, 碘化吡啶(propidium iodide, PI)、RNase A、Hoechst 33342、嘌呤霉素和维拉帕米(verapamil)购自美国Sigma公司, 慢病毒载体pLenti-CMV-Piwil2-SV40-EGFP、对照病毒pLenti-EGFP购自上海吉凯基因化学

技术有限公司, shPiwil2质粒(TG302470)、随机序列shRNA质粒(TR30013)购自美国OriGene公司, Random Primer、反转录酶和PCR试剂盒Premix Taq均购自宝日医生物技术(北京)有限公司, 顺铂(规格20 mL: 20 mg)由南京制药厂有限公司提供, CCK-8试剂盒购自东仁化学科技(上海)有限公司, Stat3(#9132)、p-Stat3(#9145)和GAPDH(#2118)一抗购自美国Cell Signaling公司, Piwil2(ab85084)一抗购自美国Abcam公司, P53(BM0102)和cyclin D1(BA0770)一抗购自武汉博士德生物工程有限公司, 所有二抗均购自美国Santa Cruz Biotechnology公司。

1.2 细胞培养及转染

宫颈癌细胞株HeLa和SiHa购自美国模式培养物保藏所(American Type Culture Collection, ATCC), 高糖DMEM(含10%FCS、100 U/mL青霉素和100 μg/mL链霉素)、于37 °C、CO₂体积分数为5%的饱和湿度条件下培养。① 过表达Piwil2: 收集对数生长期细胞, 1 × 10⁴个细胞接种6孔板, 6 h后细胞贴壁, 过表达Piwil2组细胞转染pLenti-CMV-Piwil2-SV40-EGFP, 对照组细胞转染pLenti-EGFP; ② 沉默Piwil2表达: 收集对数生长期细胞, 5 × 10³个细胞接种96孔板; 第2天, 采用LipofectamineTM3000转染shPiwil2质粒, 对照组转染随机序列shRNA质粒, 1 μg/mL嘌呤霉素压力筛选获得稳定转染细胞; 荧光观察、反转录聚合酶链反应(reverse transcription polymerase chain reaction, RT-PCR)及蛋白[质]印迹法(Western blot)检测转染效果。前期实验结果证实^[2], 对照病毒pLenti-EGFP和随机序列shRNA质粒转染对Piwil2表达及细胞生物学特性均无显著影响, 故将转染前的HeLa和SiHa细胞作为相应的统一对照。

1.3 反转录及PCR

收集对数生长期细胞, 经TRIzol充分裂解后提取总RNA并定量, 取2 μg总RNA作为模

板,按照反转录酶说明书操作获得cDNA;取1 μ L cDNA、上下游引物各1 μ L、Premix Taq 12.5 μ L、去离子水补足反应体系至25 μ L,PCR扩增条件:94 $^{\circ}$ C解链1 min,94 $^{\circ}$ C 30 s、56 $^{\circ}$ C 30 s、72 $^{\circ}$ C 45 s,共34个循环;扩增结束,取PCR产物进行琼脂糖凝胶电泳、观察结果。其中,PCR引物由宝日医生物技术(北京)有限公司合成,引物序列见表1。

表1 PCR引物序列
Tab.1 PCR primer sequence

Gene	Primer sequence (5'-3')	Length/bp
<i>Piwi2</i> -forward	ATCGCCCTCTGGTCCTGACTGT	158
<i>Piwi2</i> -reverse	CACATTGGGGCTGAAAGTCACA	
β -actin-forward	GTGGGGCGCCCCAGGCACCA	500
β -actin-reverse	CTCCTTAATGTCACGCACGATTT	

1.4 细胞增殖的检测

收集对数生长期HeLa和SiHa细胞,每100 μ L 2×10^3 个细胞接种于96孔板,分别于接种后24、48、72和96 h向各孔内加入10 μ L CCK-8溶液,37 $^{\circ}$ C继续培养4 h,振荡混匀(不可产生气泡),酶标仪上读取450 nm处吸光度(D)值。实验重复3次。

1.5 细胞周期检测

收集对数生长期细胞,将 1×10^6 个细胞加入预冷70%乙醇1 mL,于-20 $^{\circ}$ C温度下固定过夜。预冷 $1 \times$ PBS洗涤细胞2次,15 000 \times g离心5 min,弃上清液。50 μ g/mL PI(含250 μ g/mL RNase A,0.02% Triton X-100)500 μ L重悬细胞,室温避光染色30 min,并采用流式细胞术(fluorescent-activated cell sorting, FACS)进行检测。

1.6 侧群(side population, SP)细胞检测

肿瘤组织中的SP细胞具有肿瘤干细胞(cancer stem cells, CSCs)特性,通过细胞膜上ABC转运蛋白将荧光染料Hoechst 33342外排而发生拒染,维拉帕米则可阻断ABC转运蛋白的功能;SP细胞与肿瘤发生、发展、耐药及转移密切相关^[7]。为探讨*Piwi2*表达对宫颈癌

细胞中SP细胞比例的影响,分别收集HeLa、SiHa及相应沉默和过表达*Piwi2*细胞,每组细胞分为2份,含2%FCS RPMI-1640重悬细胞,调整细胞密度为 1×10^6 个/mL。加入终浓度为5 μ g/mL Hoechst 33342,其中一份细胞同时加入100 mmol/L维拉帕米,37 $^{\circ}$ C避光水浴90 min(期间,每隔15 min轻微振荡数秒)。冰上10 min终止染色,含2%FCS预冷的RPMI-1640洗涤、重悬细胞,FACS检测前加入终浓度为2 μ g/mL PI。355 nm UV激发光,610 nm双色短通反射滤镜,450和675 nm下分别检测蓝光和红光,分析SP细胞比例。

1.7 Western blot检测蛋白表达

1%NP40(含蛋白酶抑制剂和PMSF)裂解细胞提取总蛋白,取40 μ g蛋白上样,10%SDS-PAGE分离,15 V 20 min半干转至PVDF膜。5%脱脂奶封闭2 h,一抗4 $^{\circ}$ C温育过夜,TBST洗涤后加入对应二抗,室温温育2 h,TBST洗涤、ECL显色、凝胶成像系统分析结果。

1.8 顺铂敏感性检测

收集对数生长期细胞, 1×10^4 个细胞接种96孔板,6 h后分别加入连续梯度浓度的顺铂(0~24 μ g/mL),48 h后采用CCK-8试剂盒检测细胞存活率,绘制顺铂杀伤曲线,比较HeLa和SiHa细胞过表达/沉默*Piwi2*基因后对顺铂的敏感性变化。

1.9 统计学处理

所有数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,SPSS 19.0统计软件进行分析,组间差异采用配对*t*检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 *Piwi2*促进宫颈癌细胞增殖

HeLa和SiHa细胞转染慢病毒载体pLenti-CMV-*Piwi2*-SV40-EGFP,48 h后荧光显微镜下可见EGFP表达,转染效率达90%以上;宫颈癌细胞转染sh*Piwi2*质粒,采用1 μ g/mL嘌呤霉素持续压力筛选2周后,可以获得稳定转染细胞;RT-PCR和Western blot结果显示,在HeLa

和SiHa细胞*Piwi12*过表达和沉默效果均良好(图1A、B)。细胞增殖实验结果显示, 过表达*Piwi12*显著促进宫颈癌细胞增殖, 与对照组比较差异

有统计学意义($P < 0.01$); 而沉默*Piwi12*基因后, 与对照组细胞相比, 细胞增殖则被显著抑制($P < 0.01$, 图1C、D)。

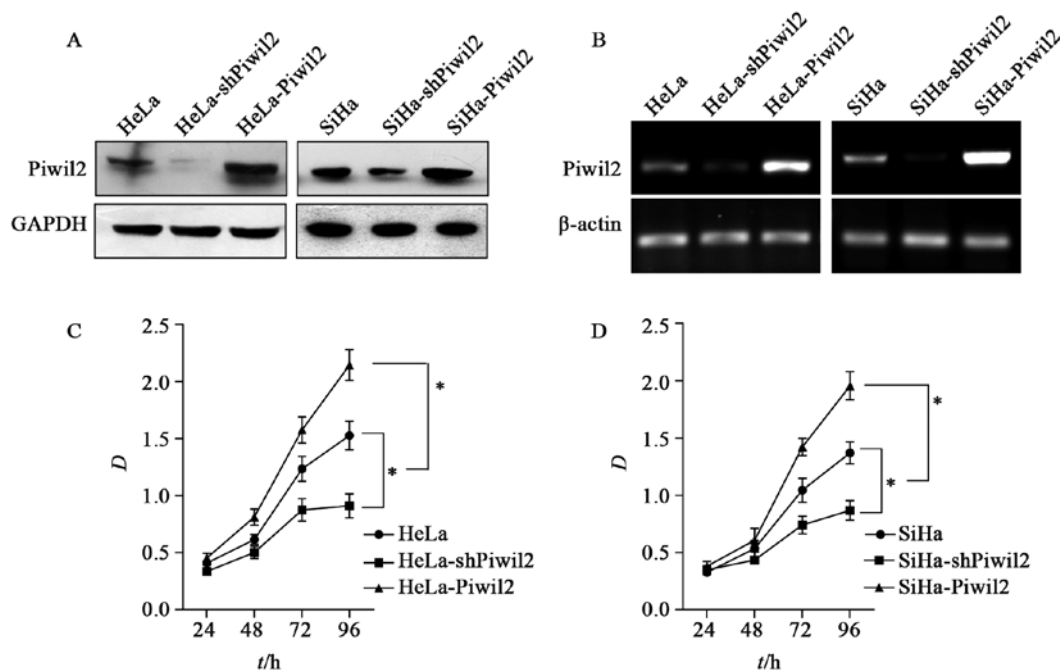


图1 过表达和沉默*Piwi12*基因对宫颈癌细胞增殖能力的影响

Fig. 1 The over-expression and silencing of *Piwi12* gene affected cervical cancer cell lines proliferation

A: Detected by Western blot; B: Detected by PCR; C: Cell viability of HeLa cells measured by CCK-8; D: Cell viability of SiHa cells measured by CCK-8. * $P < 0.01$, compared with control cells

2.2 *Piwi12*影响宫颈癌细胞周期

细胞周期检测结果显示, HeLa细胞 G_0/G_1 期、S期和 G_2/M 期细胞比例平均分别为58.92%、37.58%和3.50%, 过表达*Piwi12*后, G_0/G_1 期细胞比例(47.09%)显著减少, S期和 G_2/M 期细胞比例(45.64%和7.27%)显著增加, 与对照组比较差异均有统计学意义($P < 0.01$, $P < 0.05$); 沉默*Piwi12*基因后, 则 G_0/G_1 期细胞比例(66.84%)显著增加, 沉默前后差异有统计学意义($P < 0.01$)。SiHa细胞过表达和沉默*Piwi12*基因后, G_0/G_1 期、S期和 G_2/M 期细胞比例变化趋势与HeLa细胞一致。结果表明, *Piwi12*加快了宫颈癌细胞周期, 促进细胞增殖, 沉默*Piwi12*基因则使细胞发生细胞周期阻滞(图2)。

2.3 细胞周期相关调控蛋白的表达

进一步分析*Piwi12*促进宫颈癌细胞增殖的分子机制, Western blot结果显示, 宫颈癌细胞过表达*Piwi12*后, Stat3磷酸化水平增加, 细胞周期调控蛋白cyclin D1表达增加, P53的表达水平则显著降低; 沉默*Piwi12*基因表达, 则结果相反。过表达和沉默*Piwi12*基因前后, Stat3表达无显著变化(图3)。

2.4 *Piwi12*上调宫颈癌细胞中SP细胞比例

FACS结果显示, HeLa和SiHa细胞SP细胞比例分别为 3.01 ± 0.30 和 2.07 ± 0.21 , 过表达*Piwi12*后, SP细胞比例均显著增加(6.28 ± 0.52 和 4.20 ± 0.50), 而沉默*Piwi12*基因表达则显著降低了SP细胞比例(1.03 ± 0.20 和 1.14 ± 0.31), 与对照组细胞比较差异均有统计学意义($P < 0.01$, 图4)。

2.5 Piwil2促进宫颈癌细胞耐药

HeLa细胞及其沉默、过表达*Piwil2*基因后, 顺铂对它们的半数致死量(median lethal dose, LD₅₀)分别为4.78、3.52和8.97 μg/mL, 与对照组比较差异均有统计学意义($P < 0.05$ 和

$P < 0.01$, 图5A)。SiHa细胞及沉默、过表达*Piwil2*基因后, 顺铂LD₅₀值分别为10.21、6.06和18.64 μg/mL, 与对照组比较差异均有统计学意义($P < 0.01$, 图5B)。

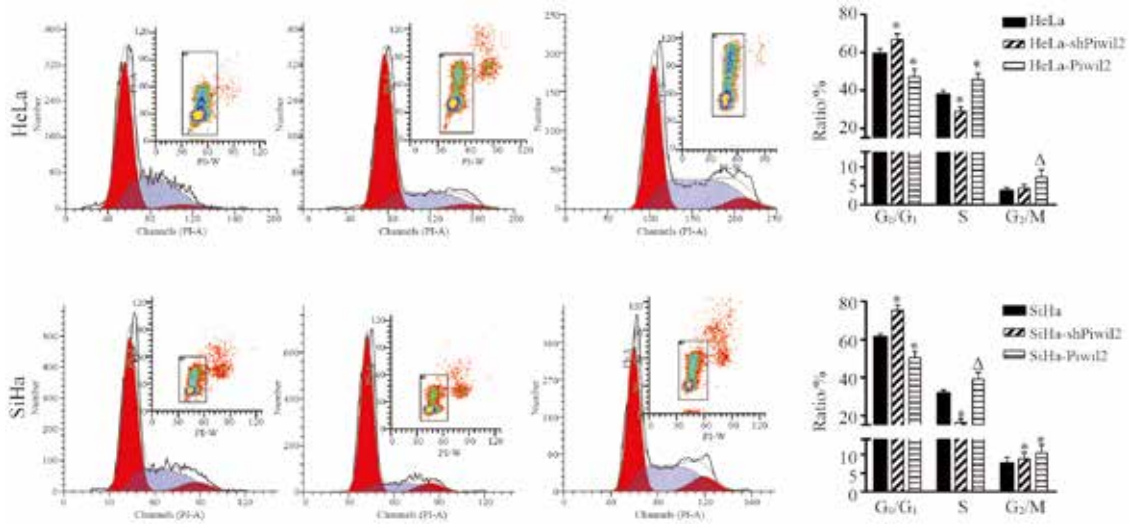


图2 FACS检测HeLa和SiHa细胞过表达或沉默*Piwil2*后细胞周期变化

Fig. 2 The cell cycle of HeLa and SiHa was analyzed by FACS

*: $P < 0.01$, compared with control cells; Δ: $P < 0.05$, compared with control cells

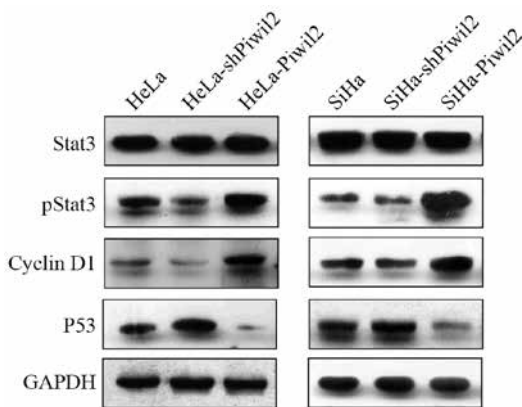


图3 Western blot检测pStat3、cyclin D1和P53的表达

Fig. 3 The expression levels of pStat3, cyclin D1 and P53 measured by Western blot

3 讨论

*Piwil2*正常表达于ESCs和GSCs, 而作为一种CAT, 在肿瘤组织和肿瘤细胞系中的表达主要在其中的癌前干细胞(precancerous stem cells, pCSCs)和CSCs群体中, *Piwil2*已经被认为是

pCSCs/CSCs特异标志物之一^[2,6,8-9]。我们前期的研究发现, 高危型HPV致癌蛋白E6/E7能够重启*Piwil2*表达, 继而通过表观遗传途径使体细胞发生重编程, 促进肿瘤起始细胞(tumor-initiating cells, TICs)形成, 在宫颈癌发生中起重要作用^[2]。本实验的结果显示, HeLa和SiHa细胞过表达*Piwil2*后, 群体中SP细胞比例显著增加, 而沉默*Piwil2*基因则显著降低SP细胞比例, 再一次验证了前期的研究结果。肿瘤干细胞是肿瘤发生、进展、转移、耐药和复发的根源, 宫颈癌的进展程度与*Piwil2*表达水平密切相关。

*Piwil2*具有强大的基因表达调控功能, 通过piRNA结合目标mRNA, *Piwil2*可发挥核酸内切酶的功能降解mRNA^[1, 10]; *Piwil2*还可以募集HP1、组蛋白甲基转移酶等, 通过表观遗传修饰途径调控基因表达^[11-13]; *Piwil2*还可以与微核糖核蛋白粒子(micro ribonucleoprotein particle, miRNP)结合, 发挥转录后调控作用^[13]。宫颈癌细胞过表达*Piwil2*后, p53蛋白水平显著降低, cyclin D1表达上调, 并且Stat3的磷酸化水

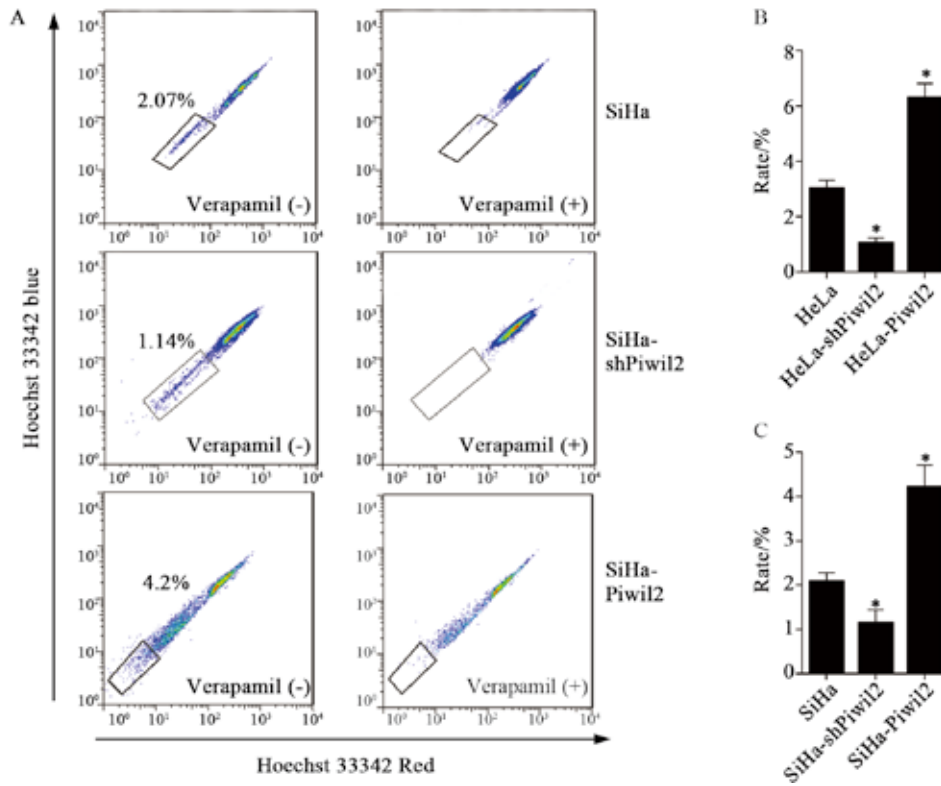


图4 FACS检测Pivwil2表达对HeLa和SiHa细胞中SP细胞比例的影响

Fig. 4 Identification of SP cells and analyses the proportion with FACS

A: SP cells detected by FACS in SiHa cells after Pivwil2 being overexpressed or silenced; B: The SP cell proportion in HeLa cells; C: The SP cell proportion in SiHa cells. * $P < 0.01$, compared with control cells

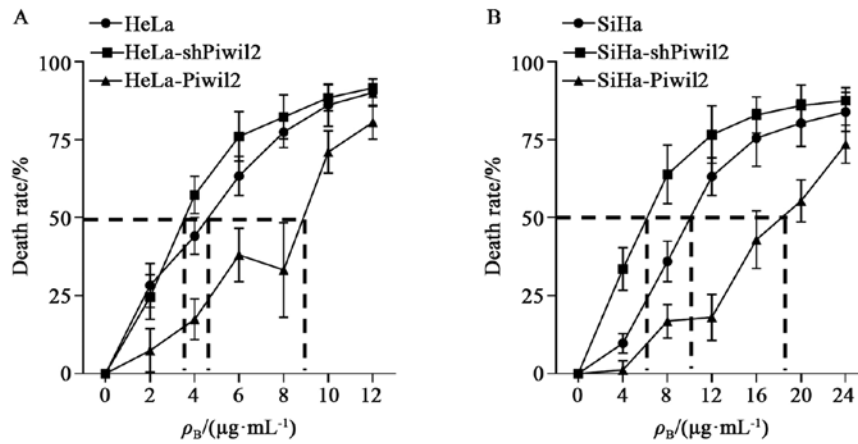


图5 Pivwil2对HeLa和SiHa细胞顺铂杀伤敏感性的影响

Fig. 5 Pivwil2 affected the sensitivity of HeLa and SiHa cells to cisplatin

A: The killing rate of cisplatin detected by CCK-8 in HeLa cells with Pivwil2 overexpression or knockdown; B: The killing rate of cisplatin in SiHa cells

平也显著增加, 沉默*Piwi2*基因则效果相反。p53、cyclin D1、pStat3参与调控细胞周期, 与细胞增殖密切相关^[14-16]。这些基因表达的改变, 正好是*Piwi2*调控细胞增殖及细胞周期变化的分子基础。我们的实验结果显示, 过表达*Piwi2*促进宫颈癌细胞增殖, 显著增加S期和G₂/M期细胞比例, 沉默*Piwi2*基因则引起细胞脱离细胞周期、阻滞于G₀/G₁期、从而抑制宫颈癌细胞增殖。

另外, 化疗药物杀伤实验结果显示, *Piwi2*还可以引起HeLa和SiHa细胞对顺铂敏感性降低, 促进化疗药物抵抗。分析原因, 可能与*Piwi2*促进SP细胞转化, 提高了SP细胞比例有关, 以及与*Piwi2*显著提高肿瘤细胞增殖活性、抑制细胞凋亡、上调耐药基因表达等因素有一定关系^[2,6,17]。相反, 沉默*Piwi2*基因则显著降低肿瘤细胞LD₅₀值, 显著提升顺铂的杀伤效率。

因此, *Piwi2*的表达在宫颈癌的发生、进展及耐药中发挥重要作用, *Piwi2*有望成为一个潜在的宫颈癌治疗靶点。

[参 考 文 献]

- [1] SONG J J, SMITH S K, HANNON G J, et al. Crystal structure of argonaute and its implications for RISC slicer activity [J] . Science, 2004, 305(5689): 1434-1437.
- [2] FENG D, YAN K, ZHOU Y, et al. *Piwi2* is reactivated by HPV oncoproteins and initiates cell reprogramming via epigenetic regulation during cervical cancer tumorigenesis [J] . Oncotarget, 2016, 7(40): 64575-64588.
- [3] YANG P, HUO Z, LIAO H, et al. Cancer/testis antigens trigger epithelial-mesenchymal transition and genesis of cancer stem-like cells [J] . Curr Pharm Des, 2015, 21(10): 1292-300.
- [4] YAZARLOO F, SHIRKOOHI R, MOBASHERI M B, et al. Expression analysis of four testis-specific genes AURKC, OIP5, PIWIL2 and TAF7L in acute myeloid leukemia: a gender-dependent expression pattern [J] . Med Oncol, 2013, 30(1): 368.
- [5] LEE J H, SCHÜTTE D, WULF G, et al. Stem-cell protein *Piwi2* is widely expressed in tumors and inhibits apoptosis through activation of Stat3/Bcl-XL pathway [J] . Hum Mol Genet, 2006, 15(2): 201-211.
- [6] FENG D, PENG C, LI C, et al. Identification and characterization of cancer stem-like cells from primary carcinoma of the cervix uteri [J] . Oncol Rep, 2009, 22(5): 1129-1134.
- [7] ORECCHIONI S, BERTOLINI F. Characterization of cancer stem cells [J] . Methods Mol Biol, 2016, 1464: 49-62.
- [8] WANG X, JIANG C, FU B, et al. MILL, a PIWI family protein, inhibits melanoma cell migration through methylation of LINE1 [J] . Biochem Biophys Res Commun, 2015, 457(4): 514-519.
- [9] GAO J X. Cancer stem cells: the lessons from pre-cancerous stem cells [J] . J Cell Mol Med, 2008, 12(1): 67-96.
- [10] PLEŠTILOVÁ L, NEIDHART M, RUSSO G, et al. Expression and regulation of PIWIL-proteins and PIWI-interacting RNAs in rheumatoid arthritis [J] . PLoS One, 2016, 11(11): e0166920.
- [11] SIMMONS M J, PETERSON M P, THORP M W, et al. piRNA-mediated transposon regulation and the germ-line mutation rate in *Drosophila melanogaster* males [J] . Mutat Res, 2015, 773: 16-21.
- [12] KLATTENHOFF C, XI H, LI C, et al. The *Drosophila* HP1 homolog Rhino is required for transposon silencing and piRNA production by dual-strand clusters [J] . Cell, 2009, 138(6): 1137-1149.
- [13] LINGEL A, SATTLER M. Novel modes of protein-RNA recognition in the RNAi pathway [J] . Curr Opin Struct Biol, 2005, 15(1): 107-115.
- [14] ESCOLL M, GARGINI R, CUADRADO A, et al. Mutant p53 oncogenic functions in cancer stem cells are regulated by WIP through YAP/TAZ [J] . Oncogene, 2017, 36(25): 3515-3527.
- [15] QU K, WANG Z, FAN H, et al. MCM7 promotes cancer progression through cyclin D1-dependent signaling and serves as a prognostic marker for patients with hepatocellular carcinoma [J] . Cell Death Dis, 2017, 8(2): e2603.
- [16] ESKANDARI E, HEIDARIAN E, AMINI S A, et al. Evaluating the effects of ellagic acid on pSTAT3, pAKT, and pERK1/2 signaling pathways in prostate cancer PC3 cells [J] . J Cancer Res Ther, 2016, 12(4): 1266-1271.
- [17] TIAN X, FAN J, HOU W, et al. Sodium orthovanadate induces the apoptosis of SH-SY5Y cells by inhibiting PIWIL2 [J] . Mol Med Rep, 2016, 13(1): 874-880.

(收稿日期: 2017-06-05 修回日期: 2017-07-25)