

儿童原发性肾病综合征患者尿源干细胞 分离培养技术研究

石冬梅 李昊 张原元 龚梦嘉 阳海平 杨宝辉 王墨* 李秋*

(重庆医科大学附属儿童医院肾脏内科, 儿童发育疾病研究教育部重点实验室,
儿童感染免疫重庆市重点实验室, 儿童发育重大疾病国家国际科技合作基地, 重庆 400014)

摘要 该研究探讨建立儿童原发性肾病综合征(primary nephrotic syndrome, PNS)尿源干细胞(urine-derived stem cells from pediatric patients with PNS, p-USCs)分离培养技术。体外分离培养细胞, 进一步观察细胞形态、分析细胞生长曲线及细胞周期、检测细胞表面标志物表达。采用茜素红及油红O染色检测细胞成骨和成脂分化潜能。结果显示, 通过离心、贴壁方法从PNS患儿尿液中分离出的细胞, 外观米粒样并呈对数生长; 细胞表达间充质干细胞表面标志物CD24(cluster of differentiation 24)、CD29、CD73、CD90, 但少数细胞表达CD105, 周细胞标志物CD146表达阳性, 造血干细胞标志物CD34表达阴性; 细胞经成骨成脂诱导后, 茜素红和油红O染色均呈阳性。以上结果表明, 该研究成功建立了PNS患儿p-USCs分离培养的方法, 为探讨p-USCs用于儿童PNS早期肾损伤的诊断及难治性肾病的治疗研究提供前期技术方法。

关键词 原发性肾病综合征; 尿源干细胞; 儿童; 尿液; 方法

Method of Isolation and Culture of Urine-Derived Stem Cells from Pediatric Patients with Primary Nephrotic Syndrome

Shi Dongmei, Li Hao, Zhang Yuanyuan, Gong Mengjia, Yang Haiping, Yang Baohui, Wang Mo*, Li Qiu*

(Department of Nephrology, Children's Hospital of Chongqing Medical University, Ministry of Education Key Laboratory of Child Development and Disorders, Chongqing Key Laboratory of Child Infection and Immunity, China International Science and Technology Cooperation Base of Child Development and Critical Disorders, Chongqing 400014, China)

Abstract The aim of this study was to establish a method for isolation and culture of urine-derived stem cells (USCs) from pediatric patients with primary nephrotic syndrome (PNS) (p-USCs). Cells were separated by centrifugation and adherent culture. The morphology, growth curve and cell cycle of cells were observed. The expression of surface markers of cells was analysed by flow cytometry. Osteogenic and adipogenic differentiation potential of cells were detected by alizarin red and Oil Red-O dye staining. We found that cells were grain-like appearance and logarithmic growth. Cells expressed surface markers associated with pericytes (CD146) and mesenchymal stem cells, such as CD24 (cluster of differentiation 24), CD29, CD73 and CD90, but a few cells expressed CD105, while didn't express hematopoietic stem cell surface marker CD34. Both of osteogenic-differentiated and adipogenic-differentiated cells were positive by alizarin red staining and Oil Red-O staining, respectively. These results showed that the method of isolation and culture USCs from pediatric patients with PNS

收稿日期: 2016-08-29 接受日期: 2016-10-18

国家自然科学基金(批准号: 81270802, 81470946)资助的课题

*通讯作者。Tel: 023-63632554, E-mail: wm66811202@sina.com; Tel: 023-63603929, E-mail: liqiu809@126.com

Received: August 29, 2016 Accepted: October 18, 2016

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.81270802, 81470946)

*Corresponding authors. Tel: +86-23-63632554, E-mail: wm66811202@sina.com; Tel: +86-23-63603929, E-mail: liqiu809@126.com

网络出版时间: 2016-11-22 13:51:34

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20161122.1351.004.html>

was established successfully, and provided an initial methods for further investigating the potential application of p-USCs in the diagnosis of early renal injury of PNS patients and the treatment of refractory nephrotic syndrome.

Keywords primary nephrotic syndrome; urinary-derived stem cells; children; urine; method

近年来, Zhang等^[1]首次从尿液中分离出一类具有良好自我增殖能力和多向分化能力的成体干细胞,称之为尿源性干细胞(urine-derived stem cells, USCs)。USCs具有广泛应用前景。一方面, USCs较间充质干细胞具有来源广泛、分离提纯过程简单和获取安全无创等特点^[2],与胚胎干细胞相比, USCs不存在伦理问题及肿瘤形成的危险。另一方面, USCs来源于肾脏,在慢性肾脏疾病(chronic kidney disease, CKD)的治疗中,较其他成体干细胞更具有脏器来源优势,且USCs可能成为反映一系列CKD早期肾损害潜在的无创性检测指标^[2]。已有文献报道, USCs是用于膀胱重建的良好种子细胞^[3]。并且有文献表明, USCs还具有神经、膀胱、骨及皮肤修复的潜能^[4-7]。在糖尿病肾病模型中, USCs注射治疗可减少肾脏局部炎症浸润及改善肾功能^[8]。故USCs是细胞治疗、组织工程研究及一系列CKD细胞治疗更为理想的种子细胞。

不同于异体干细胞移植会产生免疫排斥反应,自体干细胞是细胞治疗的最佳种子细胞来源,因此,从CKD患者尿液中分离培养USCs显得更为迫切。CKD患者尿液中多伴有大量蛋白质、结晶、红细胞及红细胞碎片等,易造成细胞污染,从而使得从CKD患者尿液分离培养出USCs更加困难。目前Zhang等^[1]和汪沅等^[9]已成功从正常成人尿液中分离培养出USCs,然而国内外尚无关于从CKD患者尿液分离出USCs的相关报道。

原发性肾病综合征(primary nephrotic syndrome, PNS)是儿童时期最常见的慢性肾脏疾病^[10],大部分患儿经激素及免疫抑制剂治疗可缓解,少部分患儿因激素耐受及反复发作,成为难治性肾病,最终逐步发展成终末肾脏疾病(end-stage renal disease, ESRD)。免疫抑制剂及细胞毒性药物治疗副作用大、疗程长、复发率高,不能理想地阻止PNS向ESRD慢性化进展,而干细胞为PNS慢性化进展治疗寻找高效、安全的手段带来机遇。本研究通过建立从PNS患儿尿液中分离和体外培养出尿原干细胞(urine-derived stem cells from pediatric patients with PNS, p-USCs)的方法,一方面为探讨p-USCs用于儿童PNS早期肾损伤的诊断及难治性肾病的治疗实验研究提

供关键技术,另一方面,探索适合从一系列CKD患者尿液中提取USCs的方法,丰富细胞治疗及组织工程研究干细胞种子来源,且为一系列CKD患者细胞治疗提供最优的自身种子细胞。

1 材料与方法

1.1 材料

细胞来源于2015年11月至2016年7月重庆医科大学附属儿童医院肾内科住院部初诊原发性肾病综合征患儿清洁中段尿,共8例。其中单纯型3例,均为男性,年龄32月~120月;肾炎型5例,女性2例,男性3例,年龄21月~84月。诊断标准是根据2001年中华医学会儿科学分会肾脏病学组制定的《小儿肾小球疾病的临床分类、诊断及治疗》^[11]。排除标准为:有尿路感染、全身性感染及遗传性疾病的患儿。

1.2 尿液收集方法

取20 mL培养基A加入200 mL无菌尿液收集器备用,收集清洁中段尿(收集尿液前,男性患儿清洗尿道口/女性患儿采用高锰酸钾坐浴1次),立即放入冰盒中,送往实验室进行分离培养。培养基A成分为含有10% FBS、100 U/mL青霉素、100 U/mL链霉素、2.5 μg/mL两性霉素B及50 μg/mL庆大霉素的DMEM培养基^[12]。

1.3 p-USCs分离培养

首先观察尿液颜色,将尿液分装入离心管(为获取单克隆细胞,需对根据尿液颜色及离心后沉淀做出相应的改变):(1)若尿液清亮透明,取50 mL/管,离心后无沉淀,直接加入12 mL培养基B(培养基B为尿源干细胞专用培养基^[1]);(2)若尿液浑浊,取50 mL/管,离心后可见白色沉淀,直接加入12 mL培养基B;(3)若尿液为茶色或洗肉水样,取20 mL/管,离心后可见红色沉淀,弃上层尿液,加入培养基2 mL,吹打混匀,取100 μL加入新的离心管中,其余弃掉或冻存,然后加入12 mL培养基B,接种到24孔板后可见大量血细胞,原代第3 d则需用PBS洗涤2次;(4)若尿液为乳糜样则弃掉。将以上样品于1 500 r/min离心5 min,弃上清,每个管加入12 mL培养基B,吹打混匀后接种到24孔板(500 μL/孔),放入37 °C、5% CO₂孵箱中培养,分

别于3、7、10 d半换液,若观察过程中有污染孔,则弃掉,观察尿源干细胞克隆的形成,最终选取细胞覆盖50%~60%的板孔进行传代。

1.4 p-USCs传代

原代培养10 d,对细胞覆盖50%~60%板孔,用0.25%胰蛋白酶(含EDTA)200 μ L消化(约2 min),培养基B终止消化,将细胞悬液移入6孔板(标记为P1)。在孔中补足培养基2 mL,置于孵箱内培养,待细胞贴壁后(4~6 h)全换液,此后每隔2 d半换液,待细胞生长覆盖70%~80%,加入0.25%胰蛋白酶400 μ L消化,将细胞传入10 cm培养皿中(标记为P2),每隔2 d半换液,待细胞生长覆盖70%~80%,加入0.25%胰蛋白酶2 mL消化,将细胞传入10 cm培养皿中(标记为P3)。

1.5 p-USCs生长曲线

取P2代p-USCs制成 1.5×10^4 /mL单细胞悬液,接种于96孔板100 μ L/孔,置于孵箱内培养,分别于1、3、5、7、9 d检测,每组设置4个复孔。实验时,每孔避光加入10 μ L CCK-8并置于孵箱中孵育4 h后,检测450 nm波长的光密度,以d为横坐标,D值为纵坐标绘制成生长曲线。

1.6 p-USCs周期检测

取P3代p-USCs制成 1×10^7 /管,1 500 r/min离心5 min,加入100 μ L PBS重悬细胞,将细胞缓慢加入含1 mL体积分数75%乙醇(-20 $^{\circ}$ C过夜预冷)的EP管中,1 000 r/min离心4 min,去上清,加入PBS洗涤2次,加入PI染液0.5 mL,4 $^{\circ}$ C孵育30 min,流式细胞仪检测。

1.7 p-USCs表面标志物检测

取P3代p-USCs按 1×10^6 /管分成8管,PBS洗涤2次(1 500 r/min离心5 min),单染,每管分别加入5 μ L抗体(鼠抗人的CD24-FITC、CD29-FITC、CD34-FITC、CD73-FITC、CD90-FITC、CD105-FITC、CD146-FITC或FITC-IgG1),4 $^{\circ}$ C避光孵育30 min,PBS洗涤2次(1 500 r/min离心5 min),加入200 μ L PBS重新制成细胞悬液,流式细胞仪检测。

1.8 p-USCs成骨分化

取P2代p-USCs以 1×10^5 /孔的密度接种于6孔板(预先用0.1%明胶包被),待细胞生长至70%~80%,更换为成骨诱导培养基,每2.5 d换液,诱导培养17 d后,弃成骨诱导液,PBS冲洗3遍,4%多聚甲醛室温固定30 min,PBS洗涤3遍,用0.1%的茜素红溶液染色5 min,PBS洗涤3遍,显微镜下观察结果并拍摄照片。

1.9 p-USCs成脂分化

取P2代p-USCs以 1×10^5 /孔的密度接种于6孔板,待细胞生长至80%~90%,更换为成脂诱导培养基,诱导14 d后,去掉诱导液,PBS洗涤3遍,4%多聚甲醛室温固定30 min,PBS洗涤3遍,经3:2稀释的油红O溶液染色30 min,PBS洗涤3遍,显微镜下观察结果并拍摄照片。

2 结果

2.1 细胞形态学观察

原代培养2~3 d,可观察到单个细胞贴壁,形态呈米粒样(图1A)。7 d左右可观察到细胞克隆呈集落状生长,细胞体积偏小,排列紧密(图1B)。10~14 d细胞数达50%~60%,可进行传代,传代培养中,细胞基本保持米粒样的形态(图1D~图1F)。每100 mL患儿尿液可获得15~600不等克隆数。

2.2 细胞生长曲线描绘及周期检测

PNS患儿尿液中分离的细胞呈对数生长(图2A),细胞传代培养1~2 d处于潜伏期,细胞生长缓慢。3~6 d细胞处于对数增长期,快速生长。第7 d细胞达平台期,细胞开始凋亡。应用流式细胞术分析细胞周期,结果显示,细胞84.76%处于G₀/G₁期,8.3%处于G₂/M期,7.0%处于S期,表明细胞具有较强的分裂增殖能力(图2B)。

2.3 细胞表面标志物的表达

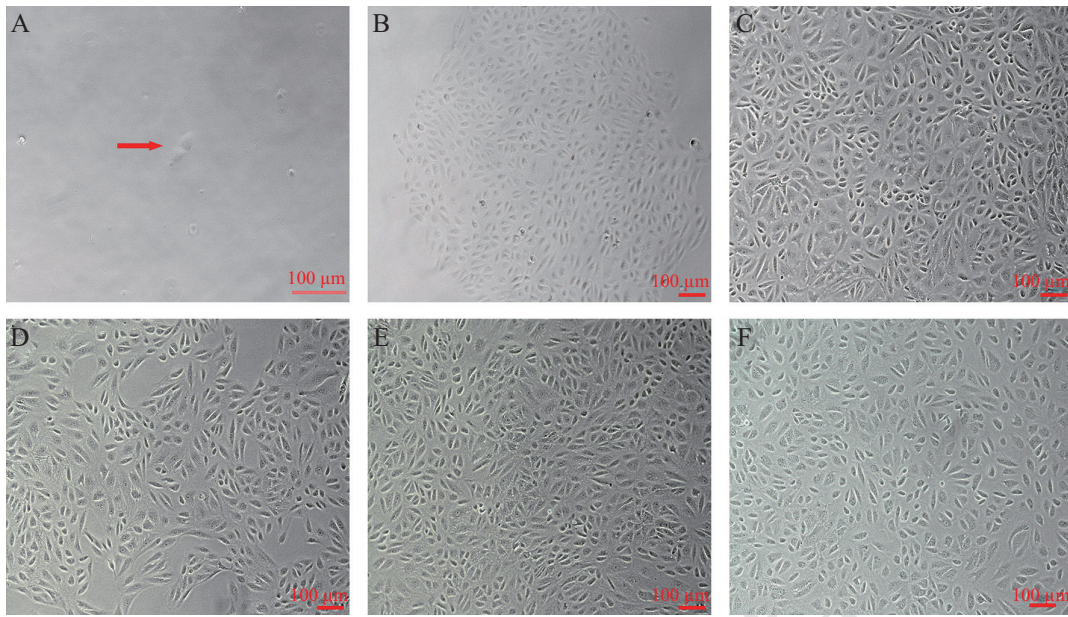
应用流式细胞术检测各种细胞表面标志物。结果显示,表达间充质干细胞表面标志物CD24、CD29、CD73、CD90的阳性率分别:98.70%、99.80%、96.10%、98.10%,少部分表达CD105(2.11%),不表达造血细胞标志CD34(0.87%),表达周细胞标志物CD146(99.90%)(图3)。

2.4 细胞成骨诱导后细胞形态观察

细胞诱导成骨后4 d形态开始变化,由米粒样逐渐向立方型转变。诱导后7 d细胞形态变化明显,细胞呈铺路石样外观,细胞聚集。诱导17 d后,细胞形态变为多角形,细胞呈多层性、重叠性排列,形成间质内含大量矿盐沉积的钙化结节(图4A)。0.1%茜素红染色矿化结节呈现红色(图4B),说明细胞具有成骨分化的潜能。

2.5 细胞成脂诱导后细胞形态观察

细胞加入成脂诱导液后14 d后,诱导而成的脂肪细胞累积脂质,脂滴变大并合并呈串珠状(图5A)。



A: 原代培养第3 d出现单个细胞, 呈米粒样(如红色箭头所指); B: 原代培养第7 d, 细胞集落样生长, 排列紧密; C~F: 分别是P1、P3、P5、P7代细胞, 细胞基本保持米粒样形态。

A: primary cells cultured for 3 d, rice-grain like (shown as red arrows); B: primary cells cultured for 7 d, formed a cluster and been compact; C-F: morphology of P1, P3, P5, P7 of cells, respectively, keeping morphology of rice-grain like.

图1 原代、P1、P3、P5及P7代细胞形态

Fig.1 Morphology of primary cell, the first passage, the third passage, the fifth passage and the seventh passage of cells

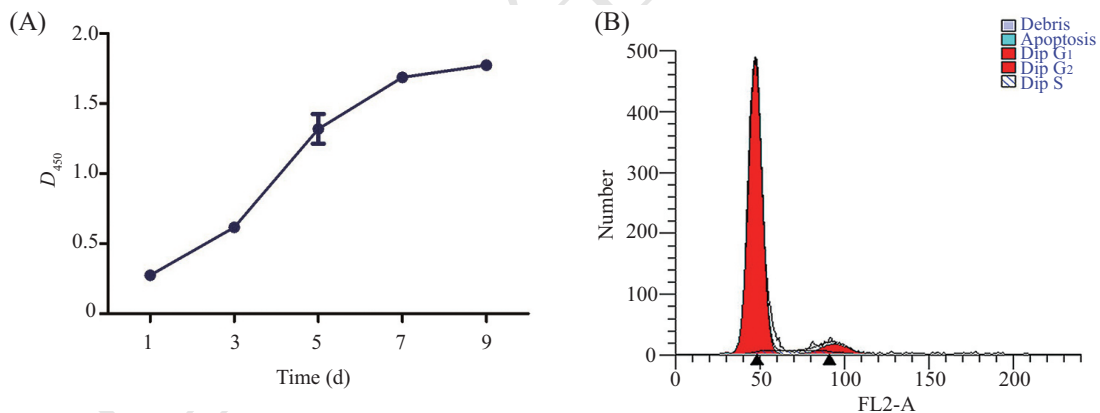


图2 细胞生长曲线(A)及细胞周期流式细胞图(B)

Fig.2 Growth curve (A) and cell cycle of cells (B)

经油红O染色呈鲜红色(图5B), 说明细胞具有成脂分化的潜能。

3 讨论

近年来, 干细胞移植治疗是当今医学研究的热点, 应用范围不断扩大, 其多向分化能力、免疫调节作用、分泌营养因子等功能用于修复损伤组织及器官、治疗恶性肿瘤、治疗自身免疫性疾病等多种难治性遗传性疾病, 挽救了大量患者的生命^[13-15]。

USCs作为一种新型成体干细胞, 成为近2年来干细胞研究热点。Zhang等^[1]和汪泱等^[9]研究组均从健康成人尿液中分离培养出USCs, 但未对CKD患者USCs分离培养方法进行阐述。本研究探索从PNS患儿尿液中分离培养USCs的方法, 由于大部分PNS患儿尿液中存在大量蛋白质、结晶、红细胞及红细胞碎片等, 原代细胞分离培养时易引起污染, 且不利于细胞贴壁及生长, 部分PNS患儿尿液里存在大量脱落细胞, 难以获得单个细胞克隆。我们对原

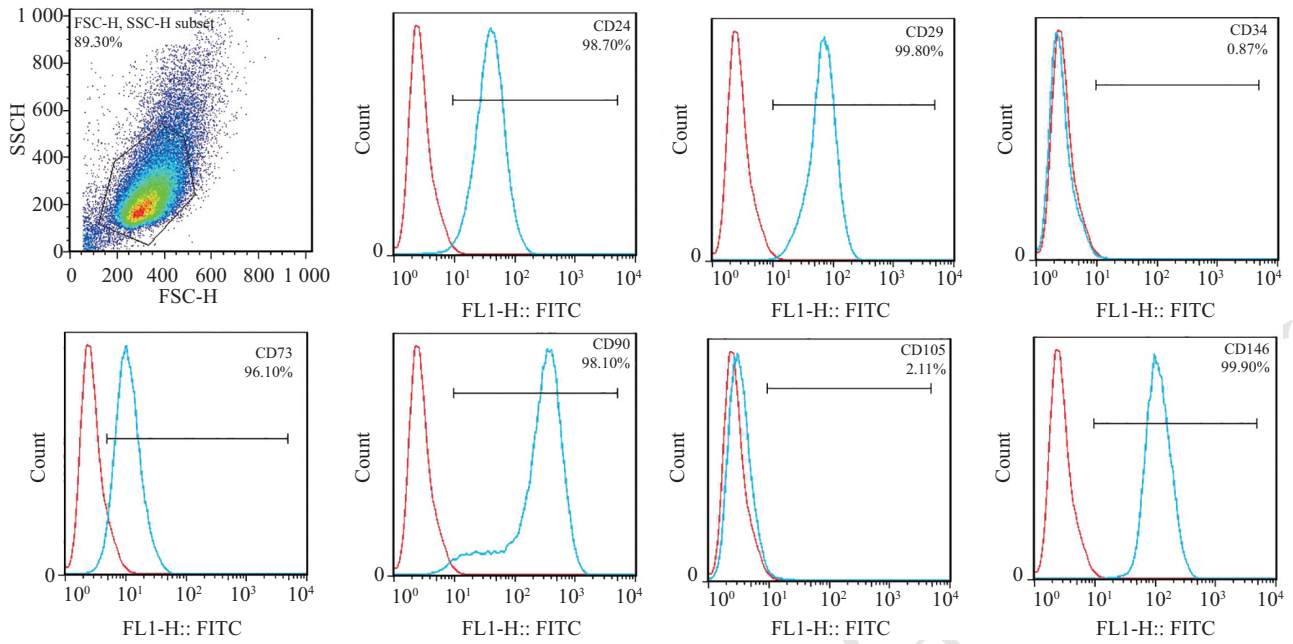
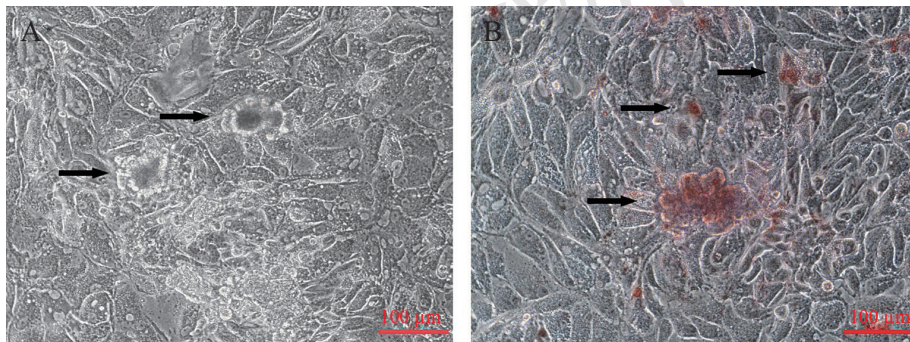


图3 细胞表面标志物CD24、CD29、CD73、CD90、CD105、CD146和CD34的流式细胞术检测结果

Fig.3 Surface markers of CD24, CD29, CD73, CD90, CD105, CD146 and CD34 in cells analysed by flow cytometry

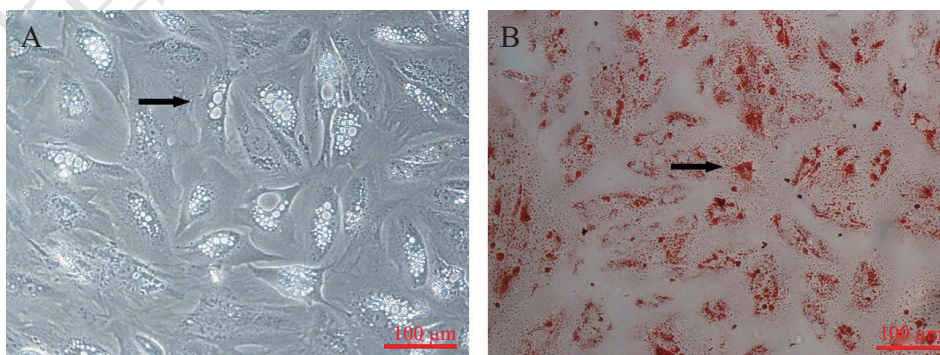


A: 成骨诱导17 d, 细胞呈多层性, 重叠形排列, 间质中形成大量钙化结节(如黑色箭头所示); B: 0.1%茜素红染色矿化结节呈红色(如黑色箭头所示)。

A: osteogenic induction for 17 d, cells were overlapped and large calcium nodules in interstitial formed (shown as black arrows); B: after 0.1% alizarin red staining, calcium nodules were red (shown as black arrows).

图4 细胞成骨诱导

Fig.4 Osteogenic induction of cells



A: 成脂诱导14 d, 细胞胞质中脂质累计, 形成大量脂滴, 成串珠样(如黑色箭头所示); B: 油红O染色, 脂滴成橘红色(如黑色箭头所示)。

A: osteogenic induction for 14 d, cytoplasmic lipid was accumulated, large lipid droplets were formed, like as beaded (shown as black arrows); B: after Oil Red O staining, lipid droplets were orange (shown as black arrows).

图5 细胞成脂诱导

Fig.5 Adipogenic of cells

有USCs分离培养方法进行改进: 第一, 本研究在培养基A中添加抗细菌及真菌药物(庆大霉素和两性霉素B)减少细胞污染; 第二, 在原代培养3 d进行全换液且用PBS轻柔洗涤, 及时换掉含有大量蛋白质和大量红细胞碎片的培养上清便于细胞贴壁及生长; 第三, 为获取单个细胞克隆, 尝试根据尿液颜色及离心沉淀两方面对离心沉淀进行稀释后接种。经过上述优化已成功从PNS患儿尿液中分离及培养出p-USCs。

通过对p-USCs分离培养观察, 原代分离及传代培养与文献报道一致^[1]。每100 mL的尿液中可获得15~600个不等的细胞克隆数, 存在较大的个体差异, 与文献所报道的健康成人每100 mL尿液可获得5~10个克隆存在较大的差异^[16]。有报道表明, USCs很有可能是肾小球壁层细胞来源, PNS患儿存在肾脏损伤, 有可能导致脱落细胞过多, 使得从100 mL尿液分离出的细胞克隆数增加^[2]。由此我们也可以推测, 每100 mL尿液里分离获得p-USCs克隆数可能与肾脏损伤程度有关, 其有可能作为反应肾脏损伤程度一个潜在指标, 也有可能代替肾脏病理活检这一有创检查指导临床用药以及预测肾病预后情况, 但我们还需要经过长时间临床试验进一步探讨研究。

本研究绘制p-USCs生长曲线及检测其细胞周期, 结果表明, p-USCs有很强的增殖能力, 且细胞周期符合干细胞特点, 与文献报道一致^[1,17]。本研究通过流式细胞术检测p-USCs表面标志物表达, 均表达间充质干细胞表面标志物CD24、CD29、CD73、CD90, 少部分表达CD105, 周细胞标志物CD146表达阳性, 造血干细胞标志物CD34表达阴性, 与文献报道一致^[1]。研究表明, USCs具有间充质干细胞特性, 在特定的培养基中可诱导分化成内皮、骨、软骨、脂肪、神经、尿道上皮及平滑肌细胞^[6]。本研究使用特定成骨、成脂诱导培养基培养p-USCs, 结果发现, 成骨诱导培养液培养17 d后, 0.1%茜素红染色矿化结节呈现红色, 成脂诱导液培养14 d后, 油红O染色呈橘红色。以上结果说明, p-USCs干细胞干性未受到影响, 具有间充质干细胞特性, 具有成骨成脂潜能。

综上所述, 尿源干细胞来源广泛, 可通过简便、安全的方法获取, 且不涉及到伦理问题。我们首次成功从PNS患者尿液中分离培养出USCs, 其在体外可以扩增传代、冻存、复苏, 且具有很好的增殖能

力和多向分化能力, 使其可作为干细胞种子用于细胞替代治疗、组织及器官重建, 使一系列CKD患者利用自身USCs移植治疗成为可能。本课题组将继续研究p-USCs特征及功能, 挖掘p-USCs在儿童PNS诊断及治疗方面的潜在应用, 为PNS患儿早期肾脏损伤的诊断提供新的无创诊断指标, 为难治性肾病患儿治疗提供新的有效方案。

参考文献 (References)

- 1 Zhang Y, McNeill E, Tian H, Soker S, Andersson KE, Yoo JJ, *et al.* Urine derived cells are a potential source for urological tissue reconstruction. *J Urol* 2008; 180(5): 2226-33.
- 2 Zhang DY, Wei GH, Li P, Zhou XB, Zhang YY. Urine-derived stem cells: A novel and versatile progenitor source for cell-based therapy and regenerative medicine. *Genes Dis* 2014; 1(1): 8-17.
- 3 Bodin A, Bharadwaj S, Wu S, Gatenholm P, Atala A, Zhang Y. Tissue-engineered conduit using urine-derived stem cells seeded bacterial cellulose polymer in urinary reconstruction and diversion. *Biomaterials* 2010; 31(34): 8889-901.
- 4 Guan JJ, Niu X, Gong FX, Hu B, Guo SC, Lou YL, *et al.* Biological characteristics of human-urine-derived stem cells: Potential for cell-based therapy in neurology. *Tissue Eng Part A* 2014; 20(13/14): 1794-806.
- 5 Wu S, Liu Y, Bharadwaj S, Atala A, Zhang Y. Human urine-derived stem cells seeded in a modified 3D porous small intestinal submucosa scaffold for urethral tissue engineering. *Biomaterials* 2011; 32(5): 1317-26.
- 6 Bharadwaj S, Liu G, Shi Y, Wu R, Yang B, He T, *et al.* Multipotential differentiation of human urine-derived stem cells: Potential for therapeutic applications in urology. *Stem Cells* 2013; 31(9): 1840-56.
- 7 Fu Y, Guan J, Guo S, Guo F, Niu X, Liu Q, *et al.* Human urine-derived stem cells in combination with polycaprolactone/gelatin nanofibrous membranes enhance wound healing by promoting angiogenesis. *J Transl Med* 2014; doi:10.1186/s12967-014-0274-2.
- 8 张超. 尿源干细胞在治疗慢性肾病大鼠模型中的应用. 上海: 第二军医大学附属长海医院(Zhang Chao. Urine-derived stem cells for the treatment of chronic kidney disease in a rat model. Shanghai: Changhai Hospital Affiliated to Second Military Medical University) 2014; 42-58.
- 9 汪泱, 关俊杰, 邓志锋. 尿液间充质干细胞的提取及扩增培养方法和应用. 中国专利(Wang Yang, Guan Junjie, Deng Zhifeng. Culture methods and amplification of mesenchymal stem cells extracted from urine. China Patent) CN201210470118.1. 2013-02-13.
- 10 中华医学会儿科学分会肾脏病学组. 91所医院1990-2002年小儿慢性肾衰竭1268例调查报告. *中华儿科杂志(The Chinese Society of Pediatric Nephrology. Analysis of 1 268 patients with chronic renal failure in childhood: A report from 91 hospitals in China from 1990 to 2002. Chin J Pediatr)* 2004; 42(10): 724-30.
- 11 中华医学会儿科学分会肾脏病学组. 小儿肾小球疾病的临床分类、诊断及治疗. *中华儿科杂志(The Subspecialty Group of*

- Nephrology, Society of Pediatrics, Chinese Medical Association. Clinical classification, diagnosis and treatment of children with glomerular diseases. *Chin J Pediatr* 2001; 39(12): 746-47.
- 12 Zhou T, Benda C, Dunzinger S, Huang Y, Ho JC, Yang J, *et al.* Generation of human induced pluripotent stem cells from urine samples. *Nat Protoc* 2012; 7(12): 2080-9.
- 13 Suzuki E, Fujita D, Takahashi M, Oba S, Nishimatsu H. Adult stem cells as a tool for kidney regeneration. *World J Nephrol* 2016; 5(1): 43-52.
- 14 Duran NE, Hommes DW. Stem cell-based therapies in inflammatory bowel disease: Promises and pitfalls. *Therap Adv Gastroenterol* 2016; 9(4): 533-47.
- 15 Fink KD, Deng P, Torrest A, Stewart H, Pollock K, Gruenloh W, *et al.* Developing stem cell therapies for juvenile and adult-onset Huntington's disease. *Regen Med* 2015; 10(5): 623-46.
- 16 Lang R, Liu G, Shi Y, Bharadwaj S, Leng X, Zhou X, *et al.* Self-renewal and differentiation capacity of urine-derived stem cells after urine preservation for 24 hours. *PLoS One* 2013; 8(1): e53980.
- 17 Bharadwaj S, Liu G, Shi Y, Markert C, Andersson KE, Atala A, *et al.* Characterization of urine-derived stem cells obtained from upper urinary tract for use in cell-based urological tissue engineering. *Tissue Eng Part A* 2011; 17(15/16): 2123-32.

中国细胞生物学学报