

# MicroRNA-153 对靶基因下游信号分子 GSK-3 $\beta$ 表达水平及细胞抗损伤能力的影响

梁春联, 朱 华, 黄 澜, 许艳峰, 邓 巍, 马春梅, 刘 颖, 秦 川

(卫生部人类疾病比较医学重点实验室, 中国医学科学院医学实验动物研究所,  
北京协和医学院比较医学中心, 北京 100021)

**【摘要】** 目的 mir-153 可负调控阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD) 主要致病基因 APP 及 APLP2 的蛋白表达, 降低其胞内降解片段(intracellular domains, ICDs) 的生成。因 ICDs 具有转录活化及促凋亡活性, 本研究旨在探讨 mir-153 对这两个靶基因下游信号分子 GSK-3 $\beta$  表达水平及细胞抗损伤能力的影响, 以期进一步阐明 mir-153 在阿尔茨海默病发病机制中的作用。方法 构建 mir-153 稳转细胞系及 mir-153 转基因小鼠, Western blot 检测该细胞系及小鼠脑内磷酸化 GSK-3 $\beta$ 、Tau 及其总蛋白的表达; A $\beta_{42}$  肽和 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 分别处理 mir-153 稳转细胞系, MTS 法检测细胞增殖活性的改变, 流式细胞术检测细胞凋亡水平的改变。结果 mir-153 稳转细胞系中磷酸化 GSK-3 $\beta$  及其总蛋白的表达下调, Tau 磷酸化水平降低。mir-153 转基因小鼠脑内, 磷酸化 GSK-3 $\beta$  及其总蛋白的表达降低, 磷酸化 Tau 及其总蛋白水平均无明显变化。A $\beta_{42}$  肽和 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 损伤作用下, mir-153 稳转细胞系的增殖活性显著降低, 凋亡水平增加。结论 mir-153 可负调控靶基因下游信号分子 GSK-3 $\beta$  的表达; 高表达 mir-153 可降低细胞抗损伤的能力。

**【关键词】** 阿尔茨海默病; MicroRNA; GSK-3 $\beta$ ; Tau; 细胞凋亡

**【中图分类号】** R541; R33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2011)08-0015-05

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2011.08.004

## Effects of MicroRNA-153 on the Expression of Its Target Gene Downstream Signaling Molecule GSK-3 $\beta$ and on the Cellular Anti-Injury Ability

LIANG Chun-lian, ZHU Hua, HUANG Lan, XU Yan-feng, DENG Wei, MA Chun-mei, LIU Ying, QIN Chuan  
(Key Laboratory of Human Disease Comparative Medicine, Ministry of Health; Institute of Laboratory Animal Science, Chinese Academy of Medical Sciences & Comparative Medical Center, Peking Union Medical College, Beijing 100021, China)

**【Abstract】 Objective** Mir-153 can negatively regulate the expression of APP and APLP2 protein, the crucial Alzheimer's disease related genes, and consequently lower the level of their intracellular degradation fragment (intracellular domains, ICDs). Considering the transcriptional activity and pro-apoptotic role of ICDs, the aim of this study was to explore the effect of mir-153 on the expression of GSK-3 $\beta$ , the downstream signaling molecule of the two target genes, and on the ability of cells against damage stress to further identify the role of mir-153 in Alzheimer's disease.

**Methods** A stably transfected cell line over-expressing mir-153 was developed and mir-153 transgenic mice were generated. Western blot was used to detect the expression of phosphorylated GSK-3 $\beta$ , Tau and their total protein in the

[基金项目] 卫生部科研专项项目(200802036)。

[作者简介] 梁春联(1975-), 博士生, 研究方向: 神经系统退行性病变。Email: liangchunlian1@sina.com。

[通讯作者] 秦川, 博士生导师。Email: qinchuan@pumc.edu.cn。

cells and mice. The mir-153 stably transfected cells were treated with A $\beta$ <sub>42</sub> peptide and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, respectively, to determine the changes of cell viability by MTS and analyze the cell apoptosis by flow cytometry. **Results** The expression of phosphorylated GSK-3 $\beta$  and its total protein were decreased and the phosphorylation of Tau was reduced in the mir-153 stably transfected cells. The expression of phosphorylated GSK-3 $\beta$  and its total protein were down-regulated and the level of phosphorylated Tau and its total protein were not significantly changed in the brain of mir-153 transgenic mice. Under the treatment of A $\beta$ <sub>42</sub> peptide and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, the viability of mir-153 stably transfected cells were clearly decreased and the apoptosis level of the cells was increased. **Conclusion** Mir-153 can negatively regulate the expression of GSK-3 $\beta$ , the downstream signaling molecule of its target genes. Over-expressed mir-153 lowers the cellular anti-injury ability.

**【Key words】** Alzheimer's disease; MicroRNA; GSK-3 $\beta$ ; Tau; Apoptosis; Mouse

MicroRNA (miRNA) 是一类长约 22 个核苷酸的内源性小分子单链 RNA, 通过抑制转录后 mRNA 的翻译或降解而调控蛋白表达。脑组织中富含 miRNA, 因此, 其在神经系统发育及疾病中发挥着重要作用。经鉴定, Mir-153 是人和小鼠脑组织特异性表达的 7 种 miRNA 之一<sup>[1]</sup>。文献报道, mir-153 可调控 a-synuclein 的表达从而在帕金森病的发病机制中起到一定的作用<sup>[2]</sup>。本课题前期研究结果表明, mir-153 可在体内外调控阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD) 主要致病基因 APP (Amyloid protein precursor, APP) 及 APLP2 (Amyloid precursor-like protein 2, APLP2) 的表达。APP 和 APLP2 同属于一类高度保守的跨膜糖蛋白家族, 且 APP 和 APLP2 经蛋白酶水解后均可生成位于胞内的小分子肽段 (intracellular domains, ICDs), 大量研究表明, 除 A $\beta$  肽外, ICDs 在 AD 的发病机制中也起着重要作用, 然而其具体的作用途径尚有待进一步阐明。文献报道, ICDs 可活化糖原合酶激酶 3 $\beta$  (glycogen synthase kinase 3 $\beta$ , GSK-3 $\beta$ ) 等基因的表达, 而 GSK-3 $\beta$  则是磷酸化 TAU 蛋白的主要激酶之一, 因此, GSK-3 $\beta$  将淀粉样蛋白沉积和 TAU 蛋白磷酸化这两个 AD 主要的病理特征紧密联系在一起<sup>[3]</sup>。然而, 关于 ICDs 的转录活化作用尚存有争议。此外, 多方研究显示 ICDs 还可降低细胞抗应激的能力、促进其凋亡水平的增加。鉴于我们前期的研究结果, mir-153 可抑制 APP 和 APLP2 的蛋白表达, 从而降低其胞内水解片段 ICDs 的水平。因此, 我们推测 mir-153 也会影响下游信号分子 GSK-3 $\beta$  的转录活性及细胞凋亡水平。为了对上述推论进行验证, 本文对高表达 mir-153 时 GSK-3 $\beta$  的蛋白水平及细胞抗氧化应激和毒性刺激的能力进行了检测, 以期进一步探讨 mir-153 在 AD 发病中的作用机制。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验动物

将鼠 mir-153 表达载体 (OriGene) 注入 C57BL/6J 小鼠受精卵细胞内, 构建 mir-153 转基因小鼠, 转基因由巨细胞病毒启动子启动表达。PCR 鼠尾鉴定成功转入外源基因的阳性小鼠, 再经 real-time PCR 筛选高表达 mir-153 的阳性小鼠作为实验动物。动物合格证号: ILAS-PL-2010-003。

### 1.2 mir-153 稳转细胞系的构建

SH-SY5Y 细胞培养于加有 10% 热灭活胎牛血清和 100 U/mL 青链霉素的 DMEM 培养液 (Gibco) 中, 使用 Lipofectamine 2000 (Invitrogen) 将 mir-153 表达载体或阴性对照质粒转入细胞内, 转染后 48 h 将细胞按一定比例稀释后传到 10 cm 皿中培养, 并加入 3  $\mu$ g/mL 的 blasticidin 进行筛选。经 3~4 周的抗性筛选后挑取带 GFP 的阳性单克隆进行扩大培养, real-time PCR 筛选高表达 mir-153 的单克隆细胞系。

### 1.3 Western-blot

提取稳转细胞系及转基因小鼠脑总蛋白, 将 40  $\mu$ g 蛋白经 12% 的 SDS-PAGE 胶分离后转移至 NC 膜上, 在含 5% 牛奶的 TBST 中室温封闭 1 h, 经鼠抗 tau 单克隆抗体 (sc-166060, Santa Cruz), 鼠抗 gsk-3 $\beta$  单克隆抗体 (sc-53931, Santa Cruz), 兔抗 p-tau 多克隆抗体 (ab4864, Abcam), 兔抗 p-gsk-3 $\beta$  多克隆抗体 (ab-75745, Abcam) 4 $^{\circ}$ C 过夜杂交, TBST 洗膜后, 与 HRP 标记的羊抗兔 IgG 进行杂交, 室温孵育 1 h, TBST 洗膜后进行化学发光反应, 同时检测甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH) 的表达作为内参。

### 1.4 A $\beta$ <sub>42</sub> 和 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 的制备及分组

如文献所述, 用六氟异丙醇 (hexafluoroisopropanol, HFIP, Sigma) 溶解冻干粉状的 A $\beta$ <sub>42</sub> 肽 (Sigma), 将

HFIP 彻底挥发后制成 Aβ 肽膜,再用无水的二甲基亚砜(DMSO, Sigma)溶解肽膜制成 5 mmol/L 的肽/DMSO 溶液,用无酚红的 F12 培养液(Gibco)将其稀释至 100 μmol/L 4°C 孵育 24 h 后即得 Aβ42 寡聚体,试验前用不含血清的培养液将其稀释至使用浓度。将 30% 的 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 溶液(北京化工厂)先用无菌的去离子水配成储存液,然后再用不含血清的培养液将其稀释至终浓度<sup>[4]</sup>。

分组:(1)对照处理组:将 mir-153 稳转细胞、阴性质粒稳转细胞分别经稀释用的无血清培养液作用 12~24 h;(2) Aβ42 处理组:mir-153 稳转细胞、阴性质粒稳转细胞分别经 10 μmol/L Aβ42 作用 12~24 h;(3) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 处理组:mir-153 稳转细胞、阴性质粒稳转细胞分别经 200 μmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 作用 12~24 h。

### 1.5 细胞增殖水平的检测

以 1.5 × 10<sup>4</sup> /孔的密度将细胞接种于 96 孔板中,培养过夜后,加入 Aβ<sub>42</sub> 或 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>,每组设 3 复孔,同时设空白孔,即不含细胞的无血清培养液孔。作用 12 h 后,使用细胞增殖检测试剂盒(G3582, Promega)于酶标仪上测定 490 nm 吸光度(A)值。按公式:细胞存活率 = (mir-153 或阴性质粒稳转细胞处理组 A 值 - 空白孔 A 值) ÷ (mir-153 或阴性质粒稳转细胞对照处理组 A 值 - 空白孔 A 值),计算各组细胞存活率。

### 1.6 细胞凋亡水平的检测

如上所述,将细胞接种于 96 孔培养板中,经

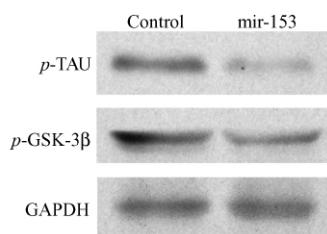


图 1 稳转细胞系内 p-tau 及 p-gsk-3β 蛋白的表达

Fig. 1 The expression of p-tau and p-gsk-3β protein in stably transfected cells

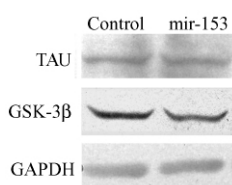


图 2 稳转细胞系内 tau 及 gsk-3β 总蛋白的表达

Fig. 2 The expression of tau and gsk-3β total protein in stably transfected cells.

Aβ<sub>42</sub> 和 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 作用 24 h 后,收集细胞调整浓度,取 1 × 10<sup>5</sup> 个细胞分别加入 5 μL annexin V 及 5 μL 7-AAD (PE annexin V apoptosis detection kit, Biosciences),室温避光孵育 15 min 后加入 binding buffer,立即上流式细胞仪分析。

### 1.7 统计分析

数据经 SPSS 软件处理,t 检验进行统计学分析,结果以  $\bar{x} \pm s$  表示,以 P < 0.05 定义为差异有显著性。

## 2 结果

### 2.1 Western blot 检测稳转细胞系及转基因小鼠体内 tau 及 gsk-3β 的表达

提取稳定转染 mir-153 表达载体及阴性对照质粒的 SY5Y 细胞总蛋白,经 12% SDS 胶分离之后检测磷酸化 tau 蛋白、磷酸化 gsk-3β 以及其总蛋白的表达。结果显示(图 1 2),以转染阴性对照质粒的稳转细胞作为对照,稳定转染 mir-153 表达载体的细胞中磷酸化 gsk-3β 及其总蛋白的表达水平均降低。同时,磷酸化 tau 蛋白的表达水平也显著降低而其总蛋白的表达无明显变化。提取 mir-153 转基因小鼠脑蛋白,同样经 Western-blot 检测上述蛋白的表达。结果显示(图 3 4 5),与稳转细胞结果相一致,转基因小鼠脑内 gsk-3β 及其总蛋白的表达水平较同窝阴性鼠均降低,而磷酸化 tau 蛋白及其总蛋白的表达则无明显变化。

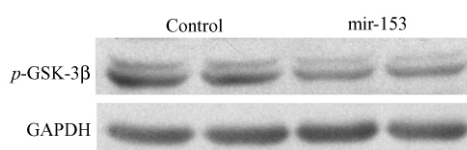


图 3 Mir-153 转基因鼠体内 p-gsk-3β 蛋白的表达

Fig. 3 The expression of p-gsk-3β protein in mir-153 transgenic mice

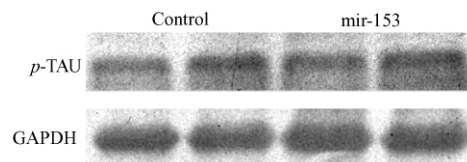


图 4 Mir-153 转基因鼠体内 p-tau 蛋白的表达

Fig. 4 The expression of p-tau protein in mir-153 transgenic mice

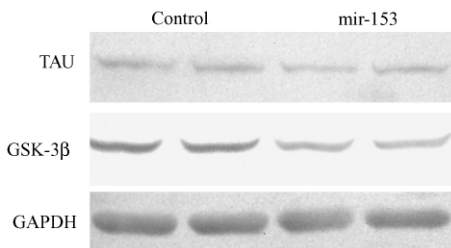


图 5 Mir-153 转基因鼠体内 tau 及 gsk-3 $\beta$  总蛋白的表达

Fig. 5 The expression of tau and gsk-3 $\beta$  total protein in mir-153 transgenic mice

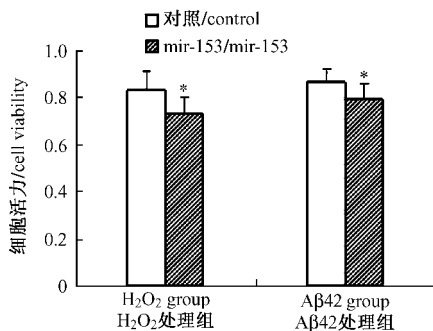


图 6 A $\beta$ 42 和 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 处理后细胞活力的检测。\*  $P < 0.05$

Fig. 6 The assay of cell viability after A $\beta$ 42 和 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treatment. \*  $P < 0.05$

## 2.2 A $\beta$ 42 和 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 处理后细胞增殖水平的检测

将稳定转染 mir-153 表达载体或阴性对照质粒的 SY5Y 细胞分别经 A $\beta$ 42 和 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 处理 12 h 后, MTS 法分析细胞增殖活力水平的变化, 每次各处理组重复 3 复孔, 试验重复 3 次, 检验进行统计学分析。结果显示(图 6), mir-153 稳转细胞系经 A $\beta$ 42 和 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 处理后, 其增殖活力均较经同样处理的阴性质粒稳转细胞系显著降低 ( $P < 0.05$ )。

## 2.3 A $\beta$ 42 和 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 处理后细胞凋亡水平的检测

将稳定转染 mir-153 表达载体或阴性对照质粒的 SY5Y 细胞分别经 A $\beta$ 42 和 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 处理 24 h 后, 流式细胞仪检测凋亡细胞数量的变化, 每次各处理组重复 2 个样本, 试验重复 2 次, 经统计分析后结果显示(图 7), mir-153 稳转细胞系与阴性质粒稳转细胞系的对照处理组间凋亡细胞数无明显差异, 表明这两种稳转细胞系的凋亡水平相同。而 mir-153 稳转细胞系经 A $\beta$ 42 或 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 处理后, 其凋亡细胞数较经同样处理的阴性质粒稳转细胞系显著增加, (分别为  $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ )。

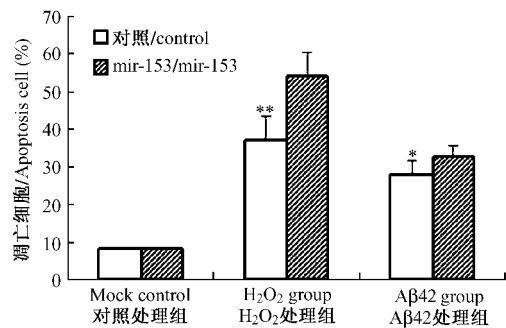


图 7 A $\beta$ 42 和 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 处理后细胞凋亡水平的检测。\*  $P < 0.05$ , \* \*  $P < 0.01$

Fig. 7 The assay of apoptosis cell after A $\beta$ 42 和 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treatment. \*  $P < 0.05$ , \* \*  $P < 0.01$

## 3 讨论

APP 是 A $\beta$  肽的前体蛋白, 其表达水平的增加可直接导致 A $\beta$  肽生成增多从而成为 AD 的主要致病基因。而其它多方研究证明 APLP2 在 AD 的发病机制中也起着重要作用<sup>[5]</sup>。作为同一家族的成员, APP 和 APLP2 的蛋白结构域和氨基酸序列高度相似(71%), 尤其是 ICD 编码区相似度更高<sup>[6]</sup>。然而, APLP2 无 A $\beta$  结构域, 因此 A $\beta$  肽仅由 APP 生成。但 APP 和 APLP2 均可经内分泌酶水解生成大小为 5KD 的胞内生物活性肽 ICDs。经多方报道, ICDs 在 AD 发生的早期事件中起着重要作用, 如: 活化 GSK-3 $\beta$  等基因的转录; 调节细胞凋亡水平及使细胞骨架结构发生改变等<sup>[7]</sup>。其中, 最受研究人员关注的是 ICDs 的基因转录活性, 但同时也是争议的焦点。究其原因主要源于对不同细胞系及动物模型的研究导致了试验结果间的差异性。

Tau 蛋白异常磷酸化导致神经纤维缠结形成是 AD 的主要病理特征之一, 可磷酸化 Tau 蛋白的激酶主要包括有 GSK-3 $\beta$ 、Cdk5、ERK 等。而鉴于文献报道, ICDs 可活化 GSK-3 $\beta$  的表达, 结合本课题前期研究结果—mir-153 可下调 APP 及 APLP2 的蛋白表达继而使细胞内 ICDs 水平降低, 因此, 本文主要通过稳转细胞系及转基因小鼠模型来探讨在高表达 mir-153 时 GSK-3 $\beta$  及 Tau 蛋白水平的变化<sup>[5, 8]</sup>。结果显示, 在 mir-153 稳转细胞系中, 磷酸化 GSK-3 $\beta$ 、GSK-3 $\beta$  总蛋白及磷酸化 Tau 蛋白的水平显著降低, 而 Tau 总蛋白则无明显变化。第 216 位酪氨酸的磷酸化是 GSK-3 $\beta$  的活化形式, 磷酸化的 GSK-3 $\beta$  及其总蛋白的降低表明在体外细胞系中, mir-153 表达水平增加可导致其靶基因水解产物 ICDs 含量的减少、

基因转录活性的降低从而使 GSK-3 $\beta$  总蛋白及其激酶活性下降、Tau 蛋白磷酸化水平降低,但却不影响 Tau 总蛋白的表达。为进一步验证上述结论,我们构建了 mir-153 转基因小鼠,并对其脑内这两种蛋白的表达进行了检测。结果显示,GSK-3 $\beta$  的表达与细胞试验相一致,所不同的是在转基因鼠脑内磷酸化 Tau 及其总蛋白的表达均无明显变化,分析原因可能归结于:机体内存在有复杂的调控机制及代偿机制;除 GSK-3 $\beta$  外,尚有其它多种激酶可催化 Tau 蛋白的磷酸化。

为进一步验证 mir-153 靶基因下游信号分子的作用,将 mir-153 稳转细胞分别经 A $\beta_{42}$  和 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 处理后,检测其抗应激损伤的能力。结果显示,应激状态下高表达 mir-153 可使细胞增殖能力降低、凋亡水平增加。这与预期结果 ICDs 减少、细胞存活率提高相悖,然而,因一种 miRNA 可同时调控多种靶蛋白的表达,除 APP、APLP2 外,研究表明<sup>[9]</sup> mir-153 尚可调控 Bcl-2 及 Mcl-1 的表达。此外,文献报道的 ICDs 的促凋亡作用多鉴于对高表达 ICDs 片段(而非其前体蛋白)的鼠和细胞的研究,而除致病作用外,在健康个体中,APP、APLP2 蛋白本身尚具有其它一些正常生理功能,如促进神经细胞的粘附、分化等,尤其值得注意的是 APP 水解后除可生成具有神经毒性作用的 A $\beta_{42}$  外,尚可生成具有神经营养作用的 sAPP- $\alpha$ ,因此,不能单纯的将 APP 定义为有害基因<sup>[10]</sup>。

综上所述, mir-153 可通过对靶蛋白 APP 及 APLP2 的调控而影响其下游信号分子 GSK-3 $\beta$  的活性,虽然 mir-153 转基因鼠脑内磷酸化 TAU 和总蛋白均不变,但除促进 TAU 磷酸化的激酶活性外, GSK-3 $\beta$  尚在其它一些细胞生物事件中发挥着作用,如:细胞周期的进程、细胞存活、细胞骨架的维持等<sup>[11,12]</sup>。且已经证实<sup>[5]</sup>,AD 患者脑内 GSK-3 $\beta$  的表达增加。此外,因 mir-153 尚可调控抗凋亡基因的表达等因素, mir-153 水平增加可降低细胞抗损伤的能力。然而,这些不同靶蛋白间的协调作用尚有待进一步的研究。

#### 参考文献:

[1] Lorenzo FS, Sarah F, Ian PR et al. Expression profiling of mammalian microRNAs uncovers a subset of brain-expressed

microRNAs with possible roles in murine and human neuronal differentiation [J]. Genome Biology 2004, 5(3): R13. 1 - 13. 11.

- [2] Doxakis E. Post-transcriptional regulation of alpha-synuclein expression by mir-7 and mir-153 [J]. J Biol Chem. 2010, 285(17): 12726 - 12734.
- [3] Chang K A, Kim H S, Ha T Y et al. Phosphorylation of amyloid precursor protein (APP) at Thr668 regulates the nuclear translocation of the APP intracellular domain and induces neurodegeneration [J]. Mol Cell Biol. 2006, 26(11), 4327 - 4338.
- [4] Stine WB Jr, Dahlgren KN, Krafft GA et al. In vitro characterization of conditions for amyloid- $\beta$  peptide oligomerization and fibrillogenesis [J]. J Biol Chem. 2003, 278(13): 11612 - 11622.
- [5] Xu Y, Kim HS, Joo Y, et al. Intracellular domains of amyloid precursor-like protein 2 interact with CP2 transcription factor in the nucleus and induce glycogen synthase kinase-3 $\beta$  expression [J]. Cell Death Differ. 2007, 14(1): 79 - 91.
- [6] Takahashi-Fujigasaki J, Breidert T, Fujigasaki H et al. Amyloid precursor-like protein 2 cleavage contributes to neuronal intranuclear inclusions and cytotoxicity in spinocerebellar ataxia-7 (SCA7) [J]. Neurobiol Dis. 2011, 41(1): 33 - 42.
- [7] Müller T, Meyer HE, Egensperger R et al. The amyloid precursor protein intracellular domain (AICD) as modulator of gene expression, apoptosis, and cytoskeletal dynamics—Relevance for Alzheimer's disease [J]. Prog Neurobiol. 2008, 85(4): 393 - 406.
- [8] Terwel D, Muyliaert D, Dewachter I et al. Amyloid activates GSK-3 $\beta$  to aggravate neuronal tauopathy in bigenic mice [J]. Am J Pathol. 2008, 172(3): 786 - 798.
- [9] Xu J, Liao X, Wong C et al. Downregulations of B-cell lymphoma 2 and myeloid cell leukemia sequence 1 by microRNA 153 induce apoptosis in a glioblastoma cell line DBTRG-05MG [J]. Int J Cancer. 2010, 126(4): 1029 - 1035.
- [10] Giliberto L, Zhou D, Weldon R et al. Evidence that the amyloid beta precursor protein-intracellular domain lowers the stress threshold of neurons and has a "regulated" transcriptional role [J]. Mol Neurodegener. 2008, 2: 3 - 12.
- [11] Grimes CA, Jope RS. The multifaceted roles of glycogen synthase kinase 3 in cellular signaling [J]. Prog Neurobiol 2001; 65: 391 - 426.
- [12] Kaytor MD, Orr HT. The GSK 3 beta signaling cascade and neurodegenerative disease [J]. Curr Opin Neurobiol 2002; 12: 275 - 278.

(修回日期)2011-03-24