

论著·实验研究

组蛋白乙酰化酶对心脏发育核心转录因子 Mef2c 的动态调控作用

彭昌 张维华 潘博 高文群 田杰

(重庆医科大学附属儿童医院心脏内科, 重庆 400014)

【摘要】 目的 观察心脏发育过程中组蛋白乙酰化酶 P300、PCAF、SRC1 对心脏发育核心转录因子 Mef2c 的动态修饰作用, 为明确先天性心脏病的发生机制奠定基础。**方法** 选取胎龄 14.5 d 和 16.5 d 胎鼠及出生后 0.5 d 和 7 d 小鼠的正常心脏组织, 采用染色质免疫共沉淀技术, 运用抗 P300、PCAF、SRC1、乙酰化组蛋白 (ac-H3) 抗体免疫沉淀与其相结合的 DNA, Real-Time-PCR 扩增抗体所富集的 DNA, 观察小鼠心脏发育过程中 Mef2c 启动子区域组蛋白乙酰化酶的动态修饰及 ac-H3 水平; 同时运用 Real-Time-PCR 检测 Mef2c mRNA 表达量。**结果** 小鼠心脏发育过程中 P300、PCAF、SRC1 均参与 Mef2c 启动子区域的乙酰化修饰, 其结合水平在心脏发育的不同阶段差异均有统计学意义 (均 $P < 0.01$)。Mef2c 启动子区域组蛋白 H3 乙酰化水平及 Mef2c 基因 mRNA 表达水平在心脏发育的不同阶段差异均有统计学意义 (均 $P < 0.01$)。ac-H3、Mef2c mRNA 及 3 种组蛋白乙酰化酶表达水平均具有一定时序性, 即在胎龄 14.5 d 时, 上述指标水平均明显高于其他时间点 (均 $P < 0.01$), 且随心脏的发育成熟表达水平均逐渐降低, 至出生后均维持在低表达水平。**结论** 小鼠心脏发育过程中 Mef2c 基因呈现动态表达, 提示 Mef2c 基因在心脏发育中具有重要作用; 同时 Mef2c 启动子区域乙酰化水平的变化受组蛋白乙酰化酶 P300、PCAF、SRC1 的动态调控。 [中国当代儿科杂志, 2014, 16(4): 418-423]

【关键词】 组蛋白乙酰化酶; 心脏发育; 转录因子; 动态调控; 小鼠

Temporal regulation of transcription factor Mef2c by histone acetylases during cardiogenesis

PENG Chang, ZHANG Wei-Hua, PAN Bo, GAO Wen-Qun, TIAN Jie. Department of Cardiology, Children's Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400014, China (Tian J, Email: jietian@cqmu.edu.cn)

Abstract: Objective To observe the temporal modification of transcription factor Mef2c by histone acetylases (HATs) P300, PCAF, and SRC1 during cardiogenesis and to provide a basis for investigating the pathogenesis of congenital heart disease. **Methods** The normal heart tissues from embryonic mice (embryonic days 14.5 and 16.5) and neonatal mice (postnatal days 0.5 and 7) were collected. The binding of P300, PCAF, and SRC1 to Mef2c gene and level of histone H3 acetylation in the promoter region of Mef2c were evaluated by chromatin immunoprecipitation assays. Meanwhile, real-time PCR was used to measure the mRNA expression of Mef2c. **Results** P300, PCAF, SRC1 were involved in histone acetylation in the promoter region of Mef2c during cardiogenesis in mice, and binding of P300, PCAF, and SRC1 to the promoter of Mef2c varied significantly in different stages of cardiogenesis ($P < 0.01$). The level of histone H3 acetylation and mRNA expression of Mef2c in the promoter region of Mef2c also varied significantly in different stages of cardiac development ($P < 0.01$). The levels of acetylated H3, Mef2c mRNA, and HATs (P300, PCAF, SRC1) changed over time. They were highest on embryonic day 14.5 ($P < 0.01$), decreased gradually with cardiac development, and were maintained at low levels after birth. **Conclusions** The mRNA expression of Mef2c varies during cardiogenesis in mice, which indicates that Mef2c plays an important role in the process of cardiac development. Meanwhile, histone acetylation in the promoter region of Mef2c is regulated temporally by HATs P300, PCAF, and SRC1. [Chin J Contemp Pediatr, 2014, 16(4): 418-423]

Key words: Histone acetylase; Cardiac development; Transcription factor; Temporal regulation; Mice

[收稿日期] 2013-09-15; [接受日期] 2014-02-22

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目 (81270234); 重庆市科委重点实验室专项经费资助项目。

[作者简介] 彭昌, 男, 博士研究生, 主治医师。

[通信作者] 田杰, 男, 教授。

据相关报道,胎儿心脏畸形的发生率为4‰~10‰,且还在逐年升高,占人类出生缺陷病例总数的1/3左右,先天性心脏病(以下简称先心病)是我国出生缺陷中最常见的疾病,已成为严重影响公共卫生、人口健康的重大社会问题^[1-2]。但先心病病因复杂,受到遗传和环境的双重影响,任何微小的变化均会导致该病的发生,目前人类仍无法从根本上解决这一世界性的难题。要明确该病是如何发生的,首先需要了解正常心脏发育的整个过程,明确心脏发育在不同的阶段及不同的部位都受哪些因素的调控,这样才能更好的为防治先心病提供充实的科学依据和干预措施。大量研究表明,Mef2c核心转录因子在心脏发育中参与了多种心脏发育基因及蛋白的调控,与心脏发育密切相关^[3-5]。因此,本研究通过探讨心脏发育相关核心转录因子Mef2c在心脏发育的几个关键时间点表达水平的变化,同时探讨组蛋白乙酰化酶P300、PCAF、SRC1对Mef2c的调控作用,为下一步明确先心病的病因提供新的理论基础。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组

选择健康成熟SPF级昆明小鼠(由重庆医科大学动物中心提供),按雌:雄=2:1比例合笼交配,次日清晨发现有阴栓的雌鼠,将胎龄(E)计为0.5 d,孕鼠分笼饲养,自由饮水进食,并计算妊娠天数。依据E和出生后日龄(P)将所有子代昆明小鼠随机分为胚胎期2组(E14.5组、E16.5组)和新生期2组(P0.5组、P7组)。

1.2 标本制备

分别取孕期E14.5和E16.5的孕鼠,二氧化碳麻醉处死,75%酒精消毒皮肤并剖腹,找到含有胚胎的串珠状子宫,轻柔地将胚胎从子宫分离出来,放入装有预冷PBS缓冲液的培养皿中冲洗,在解剖显微镜下小心剖开胎鼠的胸腔,分离心脏;E14.5组取60只胎鼠,每20只胎鼠心脏作为一个检测标本,E16.5组取45只胎鼠,每15只胎鼠心脏作为一个检测标本。P0.5组取30只新生鼠,每10只新生鼠心脏作为一个检测标本,P7组取21只新生鼠,每7只新生鼠心脏作为一个检测标本,解剖显微镜下分离新生鼠心脏。将各组完整心脏

放入预冷PBS中清洗后置于-80℃冰箱保存备用。

1.3 主要试剂及仪器

染色质免疫共沉淀(ChIP)试剂盒(Millipore,美国),ChIP级抗P300、抗PCAF和抗SRC1单克隆抗体均购自英国abcam公司,ChIP级抗乙酰化组蛋白H3(ac-H3)抗体(Millipore,美国),总RNA提取试剂盒(BioTeke,北京百泰克生物技术有限公司),SYBRI荧光定量PCR试剂盒和逆转录试剂盒均购自日本TaKaRa公司,超声破碎仪(diagenode,比利时),荧光定量PCR仪(Bio-Rad, CFX96,美国)。

1.4 ChIP法提取DNA

将各组小鼠心脏组织用眼科剪剪碎,预冷PBS清洗后加入终浓度为1%的甲醛交联。用超声破碎仪切割DNA至200~1000 bp之间。加入ChIP级P300、PCAF、SRC1和ac-H3抗体4℃摇床过夜沉淀DNA,65℃逆转交联8~10 h,纯化和回收DNA。用核酸蛋白测定仪测定A260 nm/A280 nm比值,以确定ChIP产物DNA的纯度和浓度,于-20℃保存。

1.5 ChIP-Real-Time-PCR引物序列和退火温度

选取Mef2c基因外显子5'端前1000 bp序列,针对该序列设计特异性引物。引物用Primer Premier 5.0软件设计,由宝生物公司合成。将Mef2c基因产物进行梯度稀释,运用Bio-Rad CFX96荧光定量PCR仪扩增,做出标准曲线,得到R2值和扩增效率。Mef2c引物序列:F: 5'-CACGCATCTCACCCTTGACG-3', R: 5'-CACCAGTGCCTTTCTGCTTCTCC-3',产物大小:172 bp。反应条件:95℃预变性3 min;95℃变性5 s,55℃退火15 s,68℃延伸20 s,45个循环。所得数据用Bio-Rad CFX96荧光定量PCR仪自带的基于pfaffl原理的相对定量数据分析软件分析。

1.6 Real-Time PCR引物序列和退火温度

针对Mef2c基因CDS核心编码区设计特异性引物,引物用Primer Premier 5.0软件设计,由宝生物公司合成。将Mef2c基因产物进行梯度稀释,运用Bio-Rad CFX96荧光定量PCR仪扩增,做出标准曲线,得到R2值和扩增效率。Mef2c引物序列:F: 5'-AGCGCAGGGAATGGATACG-3', R: 5'-TGCCAGGTGGGATAAGAACG-3',产物大小:157 bp。反应条件:95℃预变性30 s;

95℃变性5s, 55℃退火30s, 39个循环。选取β-actin作为内参, β-actin引物序列: F: 5'-CCTTTATCGGTATGGAGTCTGCG-3', R: 5'-CCTGACATGACGTTGTTGGCA-3', 产物大小: 104bp。反应条件: 95℃预变性30s; 95℃变性5s, 59℃退火30s, 39个循环。所得数据用Bio-Rad CFX96荧光定量PCR仪自带的基于pfaffl原理的相对定量数据分析软件进行分析。

1.7 统计学分析

应用SPSS 21.0统计软件对数据进行统计学分析, 计量资料用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 多组间比较采用单因素方差分析, 组间两两比较采用LSD-*t*检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 组蛋白乙酰化酶P300、PCAF、SRC1在Mef2c基因启动子区域的动态变化

ChIP-Real-Time-PCR结果显示, 心脏发育相关核心转录因子Mef2c启动子区域乙酰化酶P300、PCAF、SRC1结合水平均具有一定的时序性。在各时间点组, 组蛋白乙酰化酶P300、PCAF和SRC1在Mef2c基因启动子区域的表达量比较差异均有统计学意义(分别 $F=31.17$ 、 41.25 和 28.29 , 均 $P < 0.001$); 且均在E14.5时表达水平最高, 与其他时间点组(E16.5、P0.5、P7)比较, 差异均有统计学意义(均 $P < 0.01$)。随着心脏发育成熟, 所有组蛋白乙酰化酶表达量逐渐降低, 出生后呈较低水平的表达。其中P300的表达量在E16.5时高于P7($P < 0.01$); PCAF的表达量在E16.5和P7时均高于P0.5(均 $P < 0.01$)。见图1~3。

2.2 Mef2c基因启动子区域ac-H3的动态变化

ChIP-Real-Time-PCR结果表明, Mef2c基因启动子区域组蛋白H3乙酰化水平存在一定的时序性。Mef2c基因启动子区域ac-H3水平在各时间点组比较差异有统计学意义($F=273.26$, $P < 0.001$); 且在E14.5表达水平最高, 与其他时间点组(E16.5、P0.5、P7)相比差异均有统计学意义(均 $P < 0.001$); 而E16.5时ac-H3水平也均

高于P0.5和P7组(均 $P < 0.01$)。提示ac-H3随着心脏的发育成熟表达水平逐渐降低, 至出生后其表达水平明显降低。见图4。

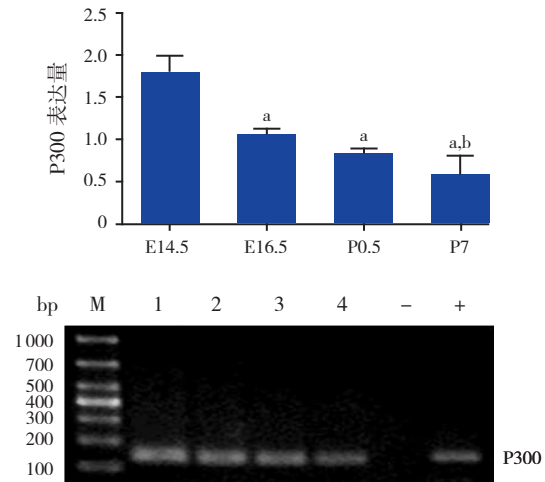


图1 P300抗体ChIP沉淀后Mef2c基因启动子区域P300表达量 上图为P300表达统计图; 注: a为与E14.5组比较, $P < 0.01$; b为与E16.5组比较, $P < 0.01$ ($n=3$)。下图为琼脂糖凝胶电泳图; M: marker; 1: E14.5; 2: E16.5; 3: P0.5; 4: P7; -: 阴性对照(正常鼠IgG免疫沉淀后的DNA扩增); +: 阳性对照(RNA多聚酶II免疫沉淀后的DNA扩增)。

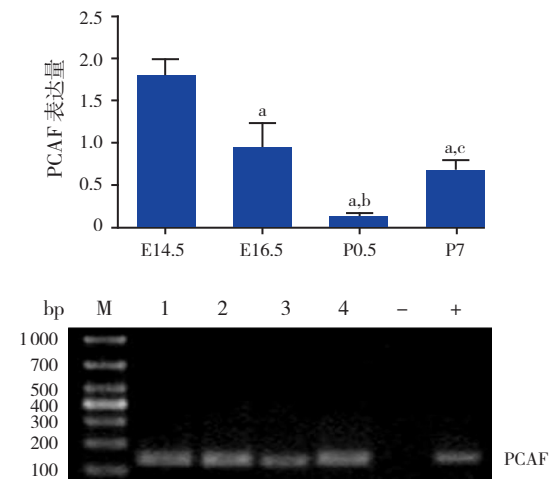


图2 PCAF抗体ChIP沉淀后Mef2c基因启动子区域PCAF表达量 上图为PCAF表达统计图; 注: a为与E14.5组比较, $P < 0.01$; b为与E16.5组比较, $P < 0.01$; c为与P0.5组比较, $P < 0.01$ ($n=3$)。下图为琼脂糖凝胶电泳图; M: marker; 1: E14.5; 2: E16.5; 3: P0.5; 4: P7; -: 阴性对照(正常鼠IgG免疫沉淀后的DNA扩增); +: 阳性对照(RNA多聚酶II免疫沉淀后的DNA扩增)。

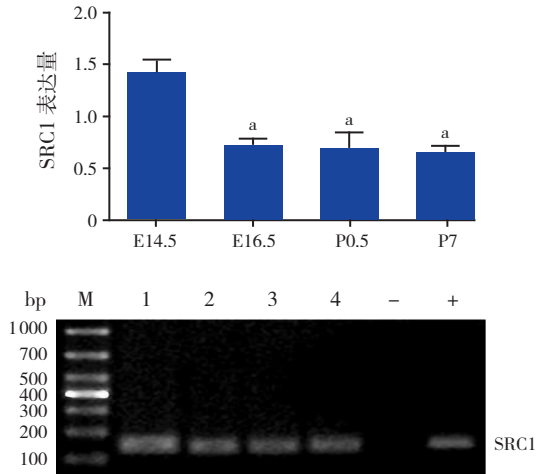


图3 SRC1 抗体 ChIP 沉淀后 Mef2c 基因启动子区域 SRC1 表达量 上图为 SRC1 表达统计图；注：a 为与 E14.5 组比较， $P<0.01$ ($n=3$)。下图为琼脂糖凝胶电泳图；M：marker；1：E14.5；2：E16.5；3：P0.5；4：P7；-：阴性对照（正常鼠 IgG 免疫沉淀后的 DNA 扩增）；+：阳性对照（RNA 多聚酶 II 免疫沉淀后的 DNA 扩增）。

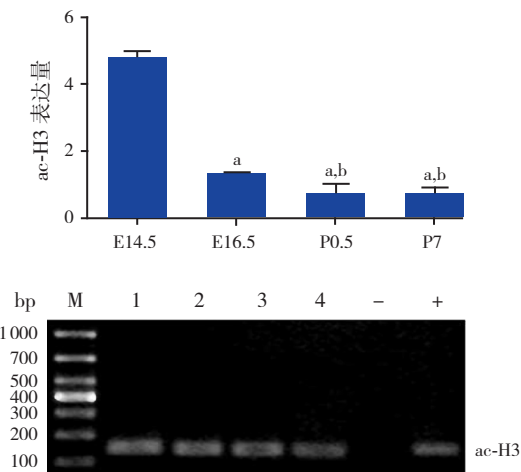


图4 ac-H3 抗体 ChIP 沉淀后 Mef2c 基因启动子区域 ac-H3 表达水平 上图为 ac-H3 表达统计图；注：a 为与 E14.5 组比较， $P<0.01$ ；b 为与 E16.5 组比较， $P<0.01$ ($n=3$)。下图为琼脂糖凝胶电泳图；M：marker；1：E14.5；2：E16.5；3：P0.5；4：P7；-：阴性对照（正常鼠 IgG 免疫沉淀后的 DNA 扩增）；+：阳性对照（RNA 多聚酶 II 免疫沉淀后的 DNA 扩增）。

2.3 心脏发育过程中 Mef2c mRNA 的动态表达

Real-Time-PCR 结果显示，在小鼠心脏发育的 4 个不同时间点（E14.5、E16.5、P0.5、P7）均能检测到心脏发育相关基因 Mef2c mRNA 的表达，且差异有统计学意义（ $F=32.14$ ， $P<0.001$ ）。Mef2c mRNA 表达的高峰期是在 E14.5，与其他时间点组（E16.5、P0.5、P7）相比，差异均有统计学意义（均 $P<0.01$ ）；且 E16.5 时 Mef2c mRNA 的表达水平也

高于 P7（ $P<0.01$ ），其变化趋势与 Mef2c 基因启动子区域 ac-H3 的变化趋势基本一致，即出生前呈高表达，随着心脏发育的成熟，出生后其表达水平明显降低。见图 5。

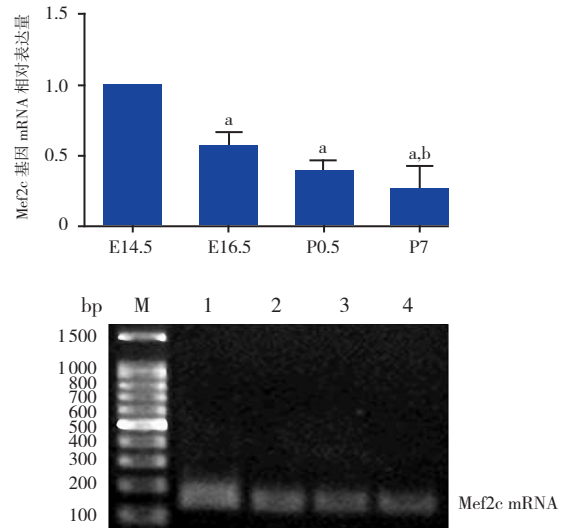


图5 Real-Time-PCR 检测小鼠心脏发育不同时间点 Mef2c mRNA 的表达水平 上图为 Mef2c mRNA 表达统计图；注：a 为与 E14.5 组比较， $P<0.01$ ；b 为与 E16.5 组比较， $P<0.01$ ($n=3$)。下图为琼脂糖凝胶电泳图；M：marker；1：E14.5；2：E16.5；3：P0.5；4：P7。

3 讨论

心脏发育是个复杂的过程，环境因素和遗传因素可能均参与了这个过程。心脏核心转录因子的顺序激活与正确表达是建造完美心脏的生物学基础。任何微小的变化都可能引起心脏发育异常，导致先心病发生^[6]。但人类对心脏正常发育的调控因素知之甚少。因此，进一步明确心脏发育相关基因的时空表达规律及其调控因素具有十分深远的意义。心脏的发育除受到遗传背景的影响，还受到表观遗传的调控，主要包括甲基化修饰、乙酰化修饰等。文献报道，心脏发育相关基因 Gata4 转录后的共价修饰包括乙酰化、甲基化、SUMO 化及磷酸化等^[7]。心脏发育相关核心转录因子 Mef2c 的共价修饰是不是也受到乙酰化的修饰及其受到哪些乙酰化酶的调控目前仍不清楚，以及在心脏发育过程中其乙酰化调控水平是否具有不同的时空规律目前仍具有较大争议。

小鼠胚胎心脏发育过程与人类及其相似。因此，本研究通过选取正常小鼠心脏发育的几个关

键时间点作为研究的时间段,探讨小鼠心脏发育过程中心脏发育相关基因 *Mef2c* 启动子区域的乙酰化水平是否受到 P300、PCAF 和 SRC1 的调控以及这些乙酰化酶的调控是否具有时序性,同时分析 *Mef2c* 启动子区域组蛋白 H3 乙酰化水平变化及 *Mef2c* mRNA 表达水平的变化,从表观遗传的全新角度探讨 *Mef2c* 基因转录后修饰中的乙酰化对心脏发育的作用,为进一步探讨环境因素导致的心脏发育异常以及对早期干预治疗先心病提供重要的理论依据。小鼠胚胎心脏发育的每个阶段都需要特定信号通路和转录因子的精确调控,目前研究较多的心脏发育核心转录因子主要有 *Nkx2.5*、*Gata4*、*Mef2c*、*Tbx5* 等^[8]。大量研究证实,每个转录因子在心脏发育的不同时期及不同部位可能均发挥不同的作用。*Mef2c* 表达异常可因为心脏的血管发育缺陷导致小鼠胚胎在 E9.5 死亡^[9]; *Gata4* 基因早期失活导致心肌发育不良和心内膜垫缺损,晚期 *Gata4* 基因失活导致心脏功能下降^[10], *Tbx5*、*Nkx2.5* 和 *Gata4* 基因突变都能导致 II 孔型房间隔缺损, *Tbx5* 的异常表达还可导致 Holt-Oram 综合征, *Nkx2.5* 等位基因低表达出现右室双出口畸形,该基因完全缺失则会出现流出道狭窄^[11-13]。提示各个转录因子在不同的时期及不同的部位均发挥不同的功能。

研究表明,心脏发育相关核心转录因子除了受到其上下游基因的调控外,表观遗传的修饰也发挥了重要作用^[14]。组蛋白乙酰化酶作为翻译后修饰的关键酶被看作是基因表达的激活子^[15]。基因的转录活化状态通常与其启动子区域组蛋白乙酰化水平息息相关,组蛋白乙酰化酶可以通过调控相关基因启动子区域组蛋白乙酰化水平来调控基因的时序表达。本研究发现,心脏发育相关基因 *Mef2c* 在小鼠心脏发育的几个关键点其组蛋白乙酰化水平均不一致,在 E14.5 时乙酰化水平最高,随着小鼠心脏发育成熟,以后逐渐降低,至出生时呈现低表达,出生前后 *Mef2c* 基因启动子区域组蛋白 H3 的乙酰化水平具有显著差异。本研究还证实, *Mef2c* 基因的 mRNA 表达水平也是出生前呈高表达,出生后逐渐降低,与组蛋白 H3 乙酰化水平变化趋势基本一致,提示组蛋白乙酰化修饰可能是调控 *Mef2c* 基因表达的一个重要因素。这也和本课题组之前的相关报道相一致^[16]。

但是组蛋白广泛存在于所有 DNA 上,对其乙酰化修饰的酶的种类繁多,因此,并不能确定有哪些乙酰化酶参与了 *Mef2c* 乙酰化的修饰。基于此原因,根据文献报道在心脏表达的组蛋白乙酰化酶主要有 P300、PCAF、SRC1、CBP、GCN5^[17],运用 P300、PCAF、SRC1 三个组蛋白乙酰化酶的 ChIP 级抗体行染色质免疫共沉淀进一步明确 *Mef2c* 转录因子启动子区域组蛋白乙酰化修饰受到哪些组蛋白乙酰化酶的调控,是否也具有一定的时序性。实验结果表明组蛋白乙酰化酶 P300、PCAF、SRC1 均参与了 *Mef2c* 基因的启动子区域乙酰化水平的调控,且其调控水平也存在动态变化。P300、PCAF、SRC1 在 E14.5 时与 *Mef2c* 基因启动子区域的结合量最多,以后随着心脏的发育成熟,其结合量也逐渐下降。出生前后乙酰化酶各个亚型的结合水平具有统计学意义,且乙酰化酶各个亚型结合水平的变化趋势与组蛋白 H3 的乙酰化水平基本相一致。这提示 P300、PCAF、SRC1 三个乙酰化酶均可能参与了心脏发育相关转录因子 *Mef2c* 的乙酰化调控。但是各个乙酰化酶之间是否具有协同作用以及是否还有其他因素参与修饰 *Mef2c* 的表达。这仍需进一步的研究证实。

心脏的发育是一个动态的过程,因此,只有全面掌握了各个基因在心脏发育不同时期的表达规律及其具体调控机制,才能从真正意义上实现对心脏发育异常的早期干预,减少先心病这一严重的出生缺陷。同时也为临床基因治疗先心病带来新的契机。

[参 考 文 献]

- [1] van der Linde D, Konings EE, Slager MA, et al. Birth prevalence of congenital heart disease worldwide: a systematic review and meta-analysis[J]. J Am Coll Cardiol, 2011, 58(21): 2241-2247.
- [2] He Y, Wang J, Gu X, et al. Application of spatio-temporal image correlation technology in the diagnosis of fetal cardiac abnormalities[J]. Exp Ther Med, 2013, 5(6): 1637-1642.
- [3] Lockhart MM, Wirrig EE, Phelps AL, et al. *Mef2c* regulates transcription of the extracellular matrix protein cartilage link protein 1 in the developing murine heart[J]. PLoS One, 2013, 8(2): e57073.
- [4] Xin M, Olson EN, Bassel-Duby R. Mending broken hearts: cardiac development as a basis for adult heart regeneration and repair[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2013, 14(8): 529-541.
- [5] Voronova A, Al MA, Fischer A, et al. Gli2 and MEF2C activate each other's expression and function synergistically during

- cardiomyogenesis in vitro[J]. *Nucleic Acids Res*, 2012, 40(8): 3329-3347.
- [6] Huang JB, Liu YL, Sun PW, et al. Molecular mechanisms of congenital heart disease[J]. *Cardiovasc Pathol*, 2010, 19(5): e183-e193.
- [7] 俞立玮, 桂永浩. Gata4 转录后蛋白共价修饰 [J]. 中国当代儿科杂志, 2012, 14(10): 800-803.
- [8] Olson EN. Gene regulatory networks in the evolution and development of the heart[J]. *Science*, 2006, 313(5795): 1922-1927.
- [9] Vong LH, Ragusa MJ, Schwarz JJ. Generation of conditional Mef2cloxP/loxP mice for temporal- and tissue-specific analyses[J]. *Genesis*, 2005, 43(1): 43-48.
- [10] Zeisberg EM, Ma Q, Juraszek AL, et al. Morphogenesis of the right ventricle requires myocardial expression of Gata4[J]. *J Clin Invest*, 2005, 115(6): 1522-1531.
- [11] Qin X, Xing Q, Ma L, et al. Genetic analysis of an enhancer of the NKX2-5 gene in ventricular septal defects[J]. *Gene*, 2012, 508(1): 106-109.
- [12] Granados-Riveron JT, Pope M, Bu'lock FA, et al. Combined mutation screening of NKX2-5, GATA4, and TBX5 in congenital heart disease: multiple heterozygosity and novel mutations[J]. *Congenit Heart Dis*, 2012, 7(2): 151-159.
- [13] Amodio V, Tevy MF, Traina C, et al. Transactivation in *Drosophila* of human enhancers by human transcription factors involved in congenital heart diseases[J]. *Dev Dyn*, 2012, 241(1): 190-199.
- [14] 夏慧苏, 余细勇. NKX2.5 基因的表观遗传学改变与先天性心脏病的关系 [J]. 实用医学杂志, 2009, 25(24): 4257-4258.
- [15] Sadoul K, Boyault C, Pabion M, et al. Regulation of protein turnover by acetyltransferases and deacetylases[J]. *Biochimie*, 2008, 90(2): 306-312.
- [16] 杨雪芳, 田杰, 陈国珍, 等. 小鼠胚胎心脏发育过程中组蛋白乙酰化酶亚型 p300 调控心脏特异转录因子的动态表达 [J]. 重庆医科大学学报, 2010, 35(7): 961-965.
- [17] Yang XJ, Seto E. HATs and HDACs: from structure, function and regulation to novel strategies for therapy and prevention[J]. *Oncogene*, 2007, 26(37): 5310-5318.

(本文编辑: 万静)