

文章编号:1001-6880(2018)6-0951-07

自噬在熊果酸诱导前列腺癌 PC3 细胞凋亡中的作用机制研究

贺安东,王允*

四川大学华西医院胸外科,成都 610041

摘要:为了探讨自噬在熊果酸抑制前列腺癌 PC3 细胞凋亡中的作用机制,PC3 细胞培养至对数生长期后,以无糖、无氨基酸培养液代替原培养液培养细胞,并用不同浓度的熊果酸进行干预。72 h 后收集细胞,采用透射电镜和免疫荧光技术观察 PC3 细胞自噬情况;Western Blot 检测 ATG5 和 Beclin-1 蛋白表达;Elisa 法测定 Caspase-3、Caspase-8 和 Caspase-9 含量;流式细胞技术检测 PC3 细胞凋亡情况。结果表明,PC3 细胞饥饿 72 h 后,细胞自噬明显增强。与对照组比较,熊果酸作用后的细胞自噬程度明显减弱;ATG5 和 Beclin-1 蛋白表达显著减少($P < 0.05$);Caspase-3、Caspase-8 和 Caspase-9 含量显著增加($P < 0.05$);PC3 细胞凋亡率极显著升高($P < 0.01$)。实验初步揭示,熊果酸可通过抑制饥饿状态的前列腺癌 PC3 细胞自噬,并进一步通过促进凋亡因子的分泌诱导其凋亡。

关键词:熊果酸;前列腺癌 PC3 细胞;自噬;凋亡**中图分类号:**R966**文献标识码:**A

DOI:10.16333/j.1001-6880.2018.6.006

The Mechanism of Autophagy in Ursolic Acid Inducing Prostatic Cancer PC3 Cells Apoptosis

HE An-dong, WANG Yun*

Department of thoracic surgery of huaxi hospital · sichuan university, Chengdu, 610041, China

Abstract:This paper is main to explore the mechanism of autophagy in ursolic acid inducing prostatic cancer PC3 cells apoptosis. PC3 cells were cultured until logarithmic growth phase, then culture medium was insteaded by sugar and amino acid free medium, and ursolic acid of different concentration was joined to intervene. PC3 cells were collected after 72 h, transmission electron microscope and immunofluorescence were used to detect PC3 cells autophagy status; expression of ATG5 and Beclin-1 proteins were detected by western blot; Caspase-3、Caspase-8 and Caspase-9 were detected by Elisa method; and the apoptosis was detected by flow cytometry. The results showed that the autophagy of PC3 cells aggravated obviously after 72 hours. Compared with the control group, cells autophagy in ursolic acid group weaked obviously; The expression of ATG5 and Beclin-1 proteins were reduced markedly($P < 0.05$), and the content of Caspase-3、Caspase-8 and Caspase-9 were reduced markedly as well($P < 0.05$). What's more, the apoptosis rate rised extremely significant($P < 0.05$). Our datas indicated that Ursolic acid may inhibit autophagy of hungry PC3 cells, which might induce cells apoptosis via facilitating the secretion of apoptosis factors.

Key words:ursolic acid;prostatic cancer PC3 cells;autophagy;apoptosis

前列腺癌在全球范围内是男性最常见的癌症之一,每年都有大量的新发病例和死亡病例,不仅危害人们的生命,还给家庭和社会带来沉重的经济负担。在中国前列腺癌的发病率在逐年上升,且由于临床症状隐匿,诊断时常已是中晚期。晚期前列腺癌经内分泌治疗一段时间后常转变成雄激素非依赖性和雄激素抵抗性前列腺癌^[1],由于前列腺癌是雄激素

敏感性肿瘤,雄激素剥夺治疗(Androgen deprivation therapy, ADT)通常用于治疗早期前列腺癌。然而由于 ADT 在内的很多化学疗法毒副作用较大,在癌症患者中引起严重的副作用,其耐药性和抗癌效果低更是重要的临床问题。因此迫切需要寻找新的治疗药物和治疗方式来治疗这类前列腺癌。其中,天然产物是其治疗的重要来源。

细胞自噬与凋亡属于两种不同的细胞进程,不同应激条件下二者相互协调,形成复杂的交叉对话,在癌症的发生和发展过程中发挥着重要作用。细胞

程序性死亡中,自噬可能比凋亡扮演更为主动的角色。它在细胞程序性死亡的早期阶段起到保护作用,还可以通过自噬使自身与其他细胞隔离以防被毁灭;然而在细胞程序性死亡后期,它则促进细胞死亡^[2,3]。因此,在癌症早期,通过激活细胞自噬可有效抑制肿瘤的生长;而在癌症晚期,通过抑制自噬的发生保留已丧失功能的大分子,从而使肿瘤无法迅速聚集、增生,最终提高抗癌药的效果。

熊果酸(ursolic acid, UA)又名乌索酸、乌苏酸,是广泛存在于天然植物中的一种三萜化合物。近年来研究表明,熊果酸对前列腺癌细胞具有显著的细胞毒和抑制作用,其机制主要是诱导前列腺癌细胞凋亡^[4]。研究表明,UA 及其衍生物可通过细胞周期阻滞和凋亡刺激抑制癌细胞的生长^[5,6]。同时UA 还可以加强肿瘤坏死因子相关的凋亡诱导配体(TRAIL)诱导的细胞凋亡并使耐药癌细胞对 TRAIL 敏感^[7]。在动物实验中,UA 可显著抑制食管癌细胞的浸润和转移^[8]。这些研究体现了UA 在治疗癌症中的潜在价值。然而,关于UA 在抗前列腺癌的潜在机制的研究报道甚少。

前期研究表明,UA 对 PC-3 细胞具有显著的细胞毒作用,IC₅₀ 为 10 μmol/L,且随浓度和时间相关地抑制雄激素非依赖性前列腺癌 PC-3 细胞生长,阻滞其细胞周期,使 PC-3 细胞大量滞留在 G₁ 期并诱导细胞凋亡^[9]。而已有研究证实,UA 可抑制 PC-3 前列腺癌细胞中的自噬,其机制可能与 LC3 的下调进而抑制对自噬体的募集有关^[10]。此外,UA 表现出在细胞凋亡之前的早期阶段以 G₁ 期阻滞和自噬抑制为特征的抗增殖作用。UA 诱导的自噬的抑制增强了UA 的抗癌作用,为提高治疗效果提供了新的策略。

在此基础上,基于肿瘤细胞自噬与凋亡之间的串话机制,本研究将初步探索熊果酸诱导 PC-3 细胞凋亡过程中,细胞凋亡与自噬之间的调控机制,为熊果酸用于前列腺癌治疗的机制奠定基础。

1 材料与仪器

1.1 细胞

前列腺癌 PC-3 细胞株,购自中科院上海细胞生物所。

1.2 药品与试剂

熊果酸,批号 A0139,纯度≥98%,购自成都曼斯特生物科技有限公司。LC3-antibody (货号:

ab38898)、ATG5-antibody (货号: ab38582)、Beclin-1 antibody (货号: ab38491) 购自英国 abcam 公司; Caspase-3 ElisaKit(货号 HS02B)、Caspase-8 ElisaKit(货号 HS09B)、Caspase-9 ElisaKit(货号 HS16B) 购自威斯腾生物。

1.3 主要仪器

H-600IV 型透射电镜(日本日立公司);Power PAC 200 型垂直式电泳仪(美国 BIO-RAD 公司);Image Lab 型凝胶分析系统(美国 BIO-RAD 公司)。

2 实验方法

2.1 细胞培养

用含 5% FCS(胎牛血清)、青霉素 100 u/mL、链霉素 100 u/mL 的 RPMI-1640 培养液培养前列腺癌 PC-3 细胞株,置于 37 °C、5% CO₂ 孵育箱中培养,3~4 天传代一次,取对数生长期的细胞用于实验。

2.2 细胞处理^[6] 和药物干预

PC-3 细胞株用 0.25% 胰蛋白酶消化,PBS 冲洗,取每毫升含 5 × 10⁴ ~ 6 × 10⁴ 个 PC-3 细胞悬液 170 μL 接种于 96 孔培养板,加入熊果酸溶液,使其终浓度分别为 5、20.0 μmol/mL。加入无糖、无氨基酸的 RPM I-1640 培养液至 200 μL,另设阳性组(加入 10 μmol/mL 的 3-MA 溶液)和对照组(只加细胞悬液 170 μL,加培养液至 200 μL),每种浓度均作 10 个平行孔,混匀后放入 CO₂ 孵箱中培养。

2.3 检测指标

2.3.1 透射电镜观察

药物干预 72 h 后,弃上清液,用 3% 的戊二醛固定 3 h,再用 1% 的锇酸固定 1 h,50% ~ 90% 的丙酮梯度脱水,Epon 812 包埋。取包埋块进行薄切片,甲苯胺蓝染色,光镜下半薄定位后进行超薄切片,醋酸铀和枸橼酸铅双染色,最后在透射电镜下观察各实验组 PC-3 细胞自噬情况。

2.3.2 免疫荧光检测

取各实验组细胞,PBS 洗涤 2 次,每次 5 min。然后用 4% 的多聚甲醛固定 30 min,再用 PBS 洗 3 次,每次 5 min。用 10% 的 BSA 封闭后加入一抗 LC3(1:1000)覆盖细胞,于 4 °C 孵育 8 h。再将玻片置于 PBS(pH7.4) 中在脱色摇床上晃动洗涤 3 次,每次 5 min。稍甩干后在圈内滴加二抗 Alexa488(1:500) 覆盖细胞,室温孵育 50 min。PBS 洗 3 次后每张切片滴加 50 ~ 100 μL DAPI 染液,室温孵育 5 min。

最后用 PBS 中洗后于荧光显微镜下观察,拍摄后用 MicroPublisher 图像分析软件进行光密度值分析。

2.3.3 Western blot 检测

取各实验组 PC-3 细胞,细胞裂解法提取细胞总蛋白,Lowry 法蛋白定量,SDS-PAGE 凝胶电泳,Western Blot 蛋白质印迹。应用全自动数码凝胶成像系统成像,使用 ScionImage 软件对蛋白电泳带进行灰度值分析,以 β -actin 作为内参照蛋白进行校准,采用目标蛋白条带灰度值/ β -actin 条带灰度值来表示 ATG5、Beclin-1 的相对蛋白表达水平。

2.3.4 Elisa 检测

Elisa 法对各实验组细胞上清液中 Caspase-3、Caspase-8 和 Caspase-9 含量进行检测:①使用前,充分混匀所有试剂,勿产生泡沫。②根据待测样品数量确定所需酶标板数量。每次实验设空白对照孔 1 孔,阴性对照、阳性对照各 2 孔。待检标本用稀释液 1:1 稀释后加入 50 μ L 于酶标板反应孔内。采用棋盘法做倍比稀释,使标本浓度依次为 40、20、10、5.0、2.5、1.25、0 IU/L。③加入稀释好后的标准品及阴性上清液 50 μ L 于反应孔,待测样品 50 μ L 于反应孔内,立即加入 50 μ L 的生物素标记的抗体。盖上膜板,轻轻振荡混匀,37 °C 孵育 1 h。④甩去孔内液体,每孔加满洗涤液,振荡 30 s,甩去洗涤液,用吸水纸拍干。重复此操作 5 次。⑤每孔加入 80 μ L

的亲和链酶素-HRP,轻轻振荡混匀,37 °C 孵育 30 min。⑥重复步骤④1 次。⑦每孔加入底物 A、B 各 50 μ L,轻轻振荡混匀,37 °C 温育 10 min。避免光照。⑧取出酶标板,迅速加入 50 μ L 终止液,加入终止液后应立即测定结果。⑨在 450 nm 波长处测定各孔的 OD 值。

2.3.5 凋亡检测

采用凋亡试剂盒进行避光染色,流式细胞仪检测细胞凋亡情况:各实验组 PC-3 细胞用 PBS 后用 0.25% 胰酶消化,用移液枪轻轻吹打、悬浮。收集细胞于流式管中,3000 rpm 离心 10 min,弃上清。沉淀细胞用 300 μ L 的 Binding Buffer 重悬,再加入 5 μ L Annexin V-FITC,混匀后避光孵育 10 min,再加入 5 μ L PI,混匀后避光孵育 5 min。1 h 内上机检测,计算 PC-3 细胞凋亡率。

2.4 统计处理

用 SPSS 17.0 软件进行统计分析。数据以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,组间采用单因素方差分析,方差齐者组间进行 LSD 检验,方差不齐者进行 Tamhane's T2 检验,以 $P < 0.05$ 为统计学意义。

3 实验结果

3.1 PC-3 细胞自噬的透射电镜观测结果

从图 1A 可见,对照组 PC-3 细胞可见较多自噬

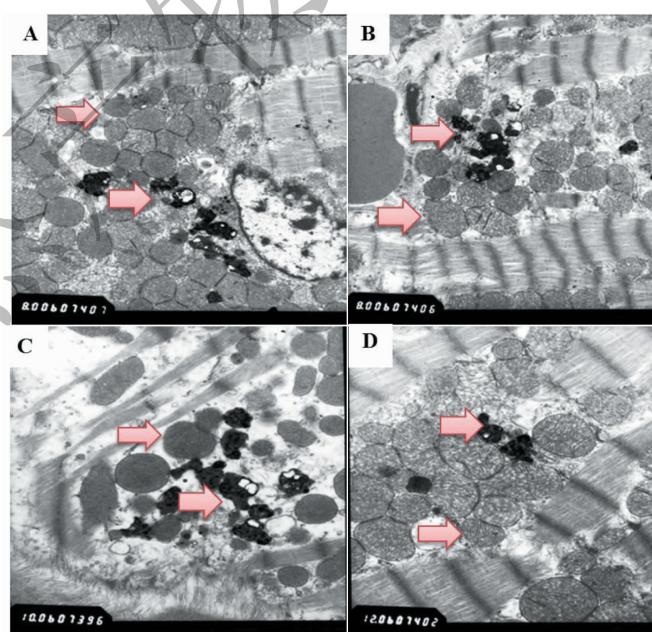


图 1 各实验组 PC-3 细胞自噬的电镜检测

Fig. 1 Electron microscopic examination of autophagy in PC-3 cells

注:A. 对照组;B. 3-MA 组;C. UA20.0 μ mol/mL;D. UA5 μ mol/mL。

Note: A. Control; B. 3-MA; C. UA20.0 μ mol/mL; D. UA5 μ mol/mL.

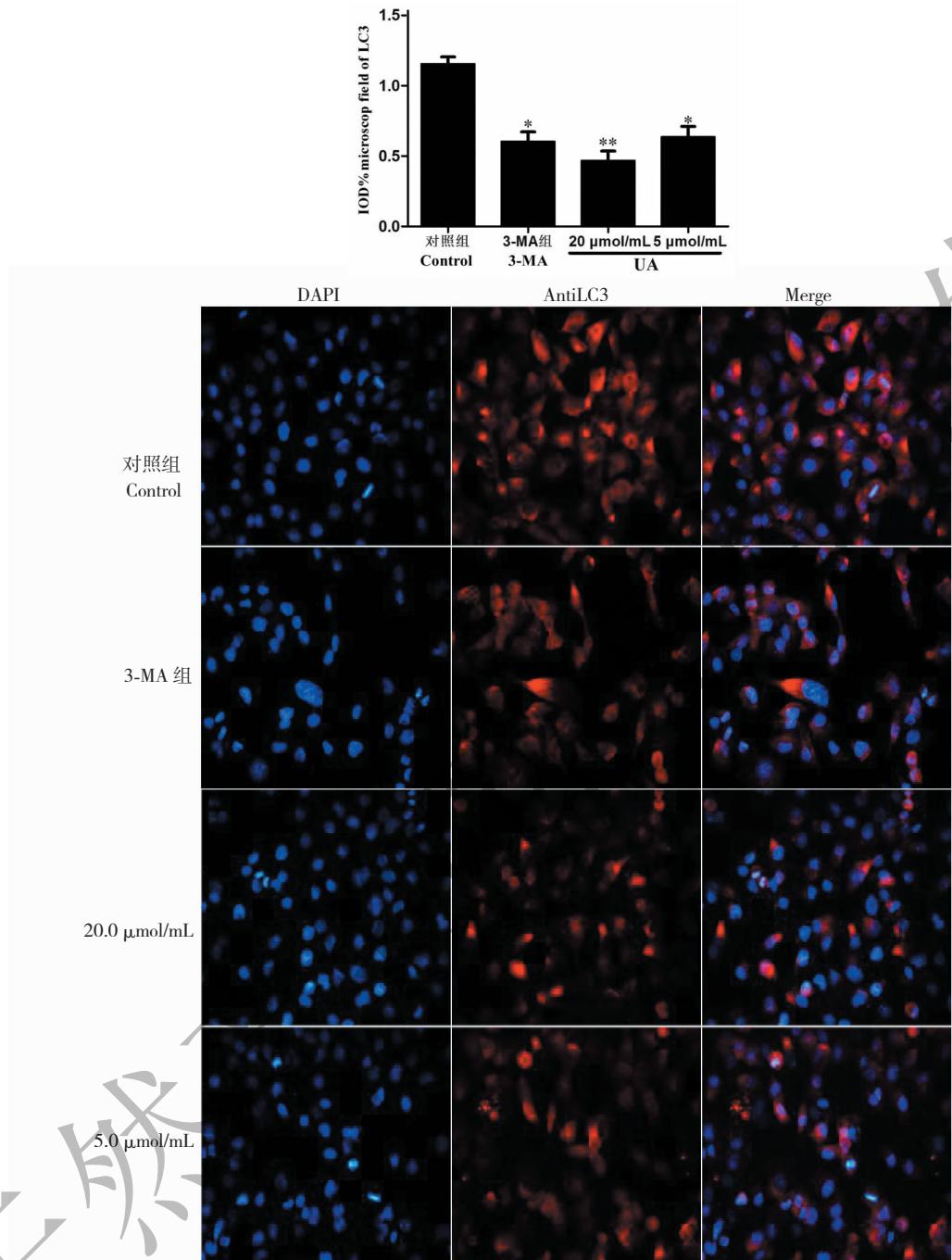


图 2 各实验组 PC-3 细胞 LC3 免疫荧光检测

Fig. 2 Immunofluorescence detection of LC3 in PC-3 cells

注:与对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

Note: Compared with the model group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

体及凋亡小体,表明饥饿状态下,PC-3 细胞发生了强烈自噬来应对不良环境。熊果酸高、低剂量组 PC-3 细胞自噬体及凋亡小体明显减少,表明熊果酸可明显抑制 PC-3 细胞自噬。如图 1C、1D 所示。

3.2 PC-3 细胞自噬的免疫荧光检测结果

从图 2E 可知,与对照组比较,熊果酸 20 $\mu\text{mol}/\text{mL}$ 组 PC-3 细胞中 LC3 荧光值极显著减弱 ($P < 0.01$),5 $\mu\text{mol}/\text{mL}$ 组显著减弱 ($P < 0.05$)。各实验组 PC-3 细胞 LC3 免疫荧光检测见图 2F。

3.3 各实验组 PC-3 细胞 ATG5 和 Beclin-1 蛋白表达

从图 3 可知,与对照组比较,熊果酸高、低剂量组 PC-3 细胞中 Beclin-1 蛋白表达均有显著减少($P < 0.05$)。熊果酸高剂量组 PC-3 细胞中 ATG5 蛋白表达极显著减少($P < 0.01$),低剂量组显著减少($P < 0.05$)。

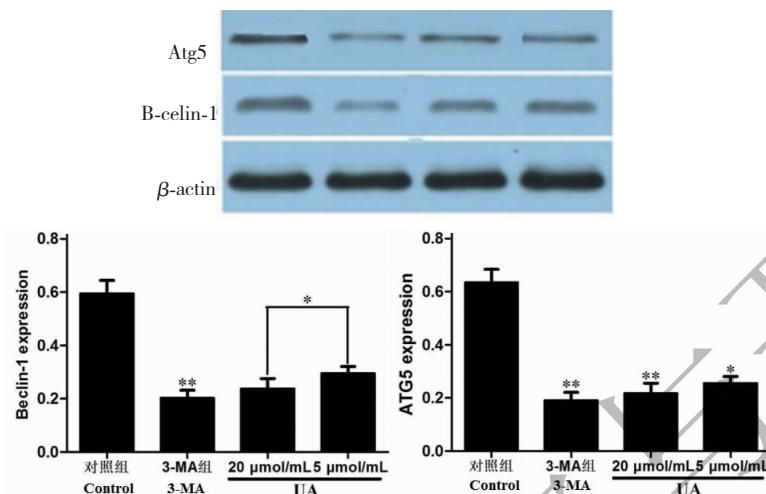


图 3 各实验组 PC-3 细胞中 Beclin-1 和 Atg5 蛋白表达

Fig. 3 Expression of Beclin-1 and Atg5 protein in PC-3 cells

注:与对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

Note: Compared with the model group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

3.4 各实验组 PC-3 细胞 Caspase-3、Caspase-8 和 Caspase-9 水平

从图 4 可知,与对照组比较,熊果酸高、低剂量

组 PC-3 细胞中 Caspase-3、Caspase-8 水平均有显著升高($P < 0.05$)。Caspase-9 水平均有极显著升高($P < 0.01$)。

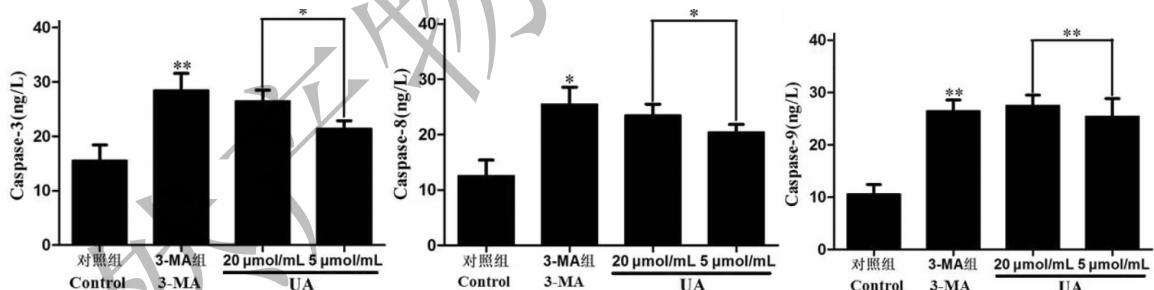


图 4 各实验组 PC-3 细胞中 Caspase-3、Caspase-8 和 Caspase-9 水平

Fig. 4 Caspase-3, Caspase-8 and Caspase-9 content in PC-3 cells

注:与对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

Note: Compared with the model group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

3.5 各实验组 PC-3 细胞凋亡率检测结果

从图 5 可知,与对照组比较,熊果酸高、低剂量组 PC-3 细胞凋亡率均有极显著升高($P < 0.01$)。

4 讨论

人类多种肿瘤中存在自噬异常,自噬在肿瘤发生发展的各个阶段均扮演着重要角色。肿瘤细胞在

恶劣的细胞外环境下(如代谢压力、缺氧、缺乏血供、养分及生长因子不足、抗肿瘤治疗等)具有很强的凋亡抵抗能力,逆境生存的能力极强,这些都有赖于肿瘤细胞的自噬活性^[11]。细胞自噬作用的研究为进一步揭示肿瘤发生及发展的潜在机制以及肿瘤的治疗和预防提供了新的思路。

前列腺癌按照发展时间分为雄激素依赖型和雄

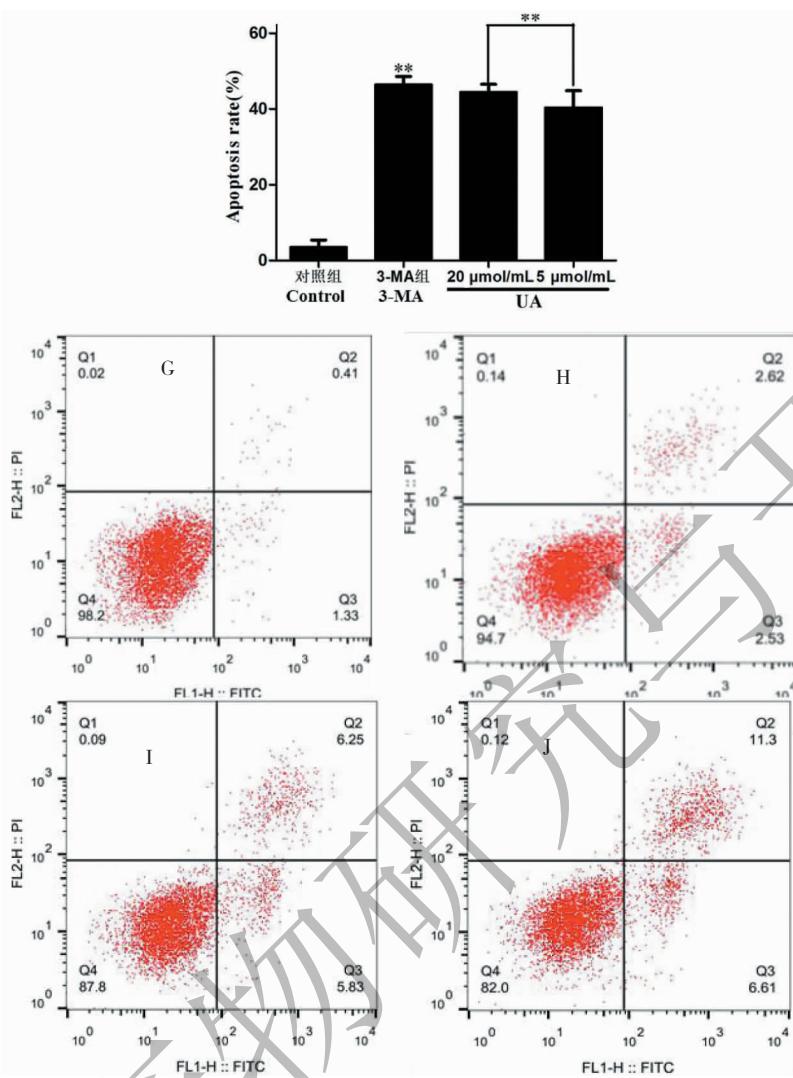


图 5 各实验组 PC-3 细胞凋亡流式检测结果

Fig. 5 FCM detection of PC-3 cell apoptosis

注: 与对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。G. 对照组; H. 3-MA 组; I. UA-20.0 $\mu\text{mol}/\text{mL}$; J. UA-5 $\mu\text{mol}/\text{mL}$ 。

Note: Compared with the model group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$. G. Control group; H. 3-MA group; I. UA-20.0 $\mu\text{mol}/\text{mL}$; J. UA-5 $\mu\text{mol}/\text{mL}$.

激素非依赖型。当前列腺癌发展为雄激素非依赖性,治疗和预后均不理想。大量实验数据与临床检测提示,前列腺癌发展为转移性激素难治性前列腺癌的过程与其化学耐药性和凋亡程序的异常调节相关^[12,13]。一般来说,在前列腺癌中自噬的研究方向主要是其对前列腺癌细胞放疗、化疗的保护功能以抵消在前列腺癌去势疗法中产生的治疗性抵抗,这是学术界对前列腺癌自噬抑制产生浓厚兴趣的原因所在^[14]。另外在非雄性激素依赖性前列腺癌细胞中,也证明自噬诱导可增加细胞对凋亡应激原和放疗的敏感性^[15]。虽然目前还不能确定自噬是晚期前列腺癌治疗由激素依赖向非依赖转变的主要机制,但相关研究已经初步证明了去除雄激素后前列

腺癌细胞中自噬过程明显增加。这充分说明了前列腺癌细胞可以借助自噬在无雄激素的不利状态下逃避凋亡。因此,抑制自噬的发生可以作为新的晚期前列腺癌的治疗方向。

饥饿法是诱导细胞自噬的一种经典方法。在肝癌、前列腺癌等肿瘤细胞的自噬研究中均有应用。本实验以无糖、无氨基酸的 RPM I-1640 培养液,37 °C, 5% CO₂ 条件下培养前列腺癌 PC-3 细胞,结果观察发现,72 h 后透射电镜下观察到典型的包裹了细胞器和蛋白的自噬体,细胞内特异性蛋白 LC-3 的表达逐渐增加,免疫荧光观察到点状的自噬体形成。证实饥饿可以诱导 PC-3 细胞自噬的发生。

自噬体形成依赖于一系列 ATG 蛋白在蛋白泛

素化过程中共价结合。ATG5 被誉为自噬的“核心”,为自噬体形成所必需,它们被发现还参与了细胞凋亡的调控^[16]。ATG5 可以被 Caplains 剪切,造成 ATG5 N 端片段以一种未知的机制转位到线粒体,与抗凋亡蛋白 Bcl-xL 结合,促发线粒体细胞色素 C 释放,诱导凋亡^[17]。凋亡相关 Caspase 家族蛋白可与自噬相关蛋白互相影响。Caspase-3 通过剪切灭活 Beclin-1 抑制自噬促发凋亡^[18]。T 细胞研究中发现 Caspase-8 调控着自噬,Caspase-8 缺陷或 Fas 死亡结构域相关蛋白缺陷的 T 细胞其自噬功能被上调^[19]。Furuya 等^[20]发现 Beclin-1 可通过提高 Caspase-9 活性而增强凋亡诱导剂诱发的细胞凋亡。

在电镜和免疫荧光检查基础上,本实验研究发现,PC-3 细胞饥饿后 ATG5 和 Beclin-1 表达显著升高,表明 PC-3 细胞面对不良环境时自噬作用增强。而 UA 作用后,PC-3 细胞 ATG5 和 Beclin-1 表达显著下调,提示 UA 可明显抑制其自噬。进一步对凋亡相关蛋白检测发现,UA 作用后,PC-3 细胞中 Caspase-3、Caspase-8 和 Caspase-9 水平显著升高,凋亡率显著升高,表明 UA 作用后 PC-3 细胞凋亡易感性明显增加。本研究显示 UA 可抑制前列腺癌 PC3 细胞发生自噬,因此它可能成为一种新型的抗肿瘤药物,为治疗晚期前列腺癌提供了理论依据。

参考文献

- Cao DH(曹德宏), Liu LR(柳良仁), Wang J(王佳), et al. Advances in the treatment of prostate cancer[J]. *West China Med*(华西医学), 2017, 32:277-281.
- Ryter SW, Mizumura K, Choi AM, et al. The impact of autophagy on cell death modalities[J]. *Int J Cell Biol*, 2014, 5: 50-56.
- Jing K, Lim K. Why is autophagy important in human diseases. *Exp Mol Med*, 2012, 44:69-72.
- Zhang FM(张明发), Shen YQ(沈雅琴). Advances in studies on urinary pharmacological effects of ursolic acid and oleanolic acid[J]. *Drug evaluation study*(药物评价研究), 2016, 39:308-316.
- Harmand PR, Duval B, Liagre C, et al. SimonUrsolic acid induces apoptosis through caspase-3 activation and cell cycle arrest in HaCat cells[J]. *Int J ncol*, 2003, 23:105-112.
- Tang C, Lu YH, Xing Y, et al. XiDownregulation of survivin and activation of caspase-3 through the PI3K/Akt pathway in ursolic acid-induced HepG2 cell apoptosis [J]. *Anticancer Drugs*, 2009, 20:249-258.
- Prasad S, Yadav VR, Kannappan R, Aggarwal Ursolic BB acid, a pentacyclic triterpene, potentiates TRAIL-induced apoptosis through p53-independent up-regulation of death receptors: evidence for the role of reactive oxygen species and JNK[J]. *J Biol Chem*, 2010, 86:5546-5557.
- Cha H, Park T, Seiki HMW, et al. KimUrsolic acid-induced down-regulation of MMP-9 gene is mediated through the nuclear translocation of glucocorticoid receptor in HT1080 human fibrosarcoma cells[J]. *Oncogene*, 1998, 16:771-778.
- Chen K(陈科), Cheng F(程帆), Yan P(颜鹏), et al. Effect of ursolic acid on prostate cancer cell apoptosis and its mechanism[J]. *J Liaoning Colle Tradit Chin Med*(辽宁中医药大学学报), 2014, 16:37-40.
- Shin SW, Kim SY, Park JW. Autophagy inhibition enhances ursolic acid-induced apoptosis in PC3 cells[J]. *Bio Biophys Acta*, 2012, 1823:451-457.
- Wu J, Kong F, Pan Q, et al. Autophagy protects against cholesterol-induced apoptosis in pancreatic β -cells[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2017, 482:678-685.
- Roy A, Ramalinga M, Kim OJ, et al. Multiple roles of RARRES1 in prostate cancer:autophagy induction and angiogenesis inhibition[J]. *PloS One*, 2017, 12:e0180344.
- Kumar D, Shankar S, Srivastava RK, et al. Rottlerin induces autophagy and apoptosis in prostate cancer stem cells via PI3K/Akt/mTOR signaling pathway [J]. *Cancer Letters*, 2014, 343:179-189.
- Bristol ML, Emery SM, Gewirtz DA, et al. Autophagy inhibition for chemosensitization and radiosensitization in cancer: do the preclinical data support this therapeutic strategy[J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2013, 344:544-552.
- He Z, Mangala LS, Theriot CA, et al. Cell killing and radiosensitizing effects of atorvastatin in PC3 prostate cancer cells [J]. *J Radiation Res*, 2012, 53:225-233.
- Li X(李新), Zhu LH(朱璐宏). Analysis of the correlation between autogly-associated gene Atg and prostate adenocarcinoma[J]. *Chin J Andrology*(中华男科学杂志), 2015, 21: 31-34.
- Saita S, Shirane M, Nakayama KI, et al. Selective escape of proteins from the mitochondria during mitophagy [J]. *Nat Communications*, 2013, 4:1410-1416.
- Fu LL, Cheng Y, Liu B. Beclin-1: autophagic regulator and therapeutic target in cancer[J]. *International J Biochemistry & Cell Biology*, 2013, 45:921-924.
- Bell B D, Leverrier S, Weist B M, et al. FADD and caspase-8 control the outcome of autophagic signaling in proliferating T cells[J]. *Autophagy*, 2009, 105:16677-16682.
- Furuya D, Tsuji N, Yagihashi A, et al. Beclin1 augmented cis-diamminedichloroplatinum induced apoptosis via enhancing caspase-9 activity [J]. *Exper Cell Res*, 2005, 307: 26-40.