

H₂O₂ 预处理对骨髓间质干细胞凋亡适应性保护作用的研究

邓宇斌^{1*}, 李士勇¹, 叶伟标¹, 叶美红¹, 吴洪福¹, 黄应雄¹, 冯鉴强²

(中山大学中山医学院 1. 病理生理教研室, 2. 生理教研室, 广东 广州 510080)

摘要:【目的】探讨低浓度 H₂O₂ 预处理对高浓度 H₂O₂ 引起骨髓间质干细胞凋亡的影响。【方法】大鼠骨髓间质干细胞(BMSC)经体外培养扩增、纯化、鉴定。BMSC 分别被暴露于 0, 50, 100, 200, 300, 400, 500 μmol/L H₂O₂, 流式细胞仪(FCM)检测不同浓度 H₂O₂ 处理对 BMSC 细胞凋亡的影响。然后分别用 20 μmol/L, 50 μmol/L, 100 μmol/L H₂O₂ 预处理 24 h, 用 FCM 和 Hoechst33324 染色观察低浓度 H₂O₂ 预处理对高浓度 H₂O₂ 引起骨髓间质干细胞凋亡的影响, RT-PCR 检测不同浓度 H₂O₂ 预处理组 BMSC Caspase-3 和 Bcl-2 基因的表达。【结果】BMSC 经体外培养扩增、流式细胞仪鉴定, 符合其表面标志, FCM 检测凋亡显示: H₂O₂ 呈浓度依赖性诱导 BMSC 凋亡, 且 50 μmol/L H₂O₂ 预处理可降低 500 μmol/L H₂O₂ 诱导的 BMSC 凋亡率; Hoechst33324 染色结果显示: 对照组 BMSC 染色质分布均匀, 为弥散均匀的低强度荧光; 500 μmol/L H₂O₂ 组 BMSC 胞核呈浓染致密的固缩形态或颗粒状荧光; 50 μmol/L H₂O₂ 预处理组所致的凋亡细胞数明显少于 500 μmol/L H₂O₂ 处理组所引起的细胞凋亡数, 100 μmol/L H₂O₂ 预处理组所致的凋亡细胞数与 500 μmol/L H₂O₂ 处理组比较无明显差异。RT-PCR 结果显示 50 μmol/L H₂O₂ 预处理组与单独使用 500 μmol/L H₂O₂ 处理组比较, 其 BMSC 的 Bcl-2 表达增加和 Caspase-3 基因表达降低($P < 0.05$), 100 μmol/L H₂O₂ 预处理组与单独使用 500 μmol/L H₂O₂ 处理组比较, 其 BMSC 的 Bcl-2、Caspase-3 表达无明显差异($P > 0.05$)。【结论】低浓度 H₂O₂ 预处理对 BMSC 凋亡具有适应性保护作用, 其机制可能与 H₂O₂ 预处理使 BMSC Bcl-2 基因表达增加和 Caspase-3 基因表达降低有关。

关键词: 过氧化氢; 凋亡; BMSC

中图分类号: R331 文献标识码: A 文章编号: 1672-3554(2009)04-0372-05

Research of Adaptive Protection of Preconditioning with Hydrogen Peroxide in Bone Marrow Mesenchymal Cells Against Apoptosis

DENG Yu-bin¹, LI Shi-yong¹, YE Wei-biao¹, YE Mei-hong¹, WU Hong-fu¹, HUANG Ying-xiong¹, FENG Jian-qiang²

(1. Department of Pathophysiology, 2. Department of Physiology, Zhongshan School of Medicine, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510080, China)

Abstract: 【Objective】 To investigate the effects of preconditioning with low concentration of hydrogen peroxide (H₂O₂) on oxidative stress-induced BMSC apoptosis. 【Methods】 In vitro separation, purification, culture, and amplification of bone marrow mesenchymal stem cells were performed. BMSC were insulted with 0, 50, 100, 200, 300, 400, 500 μmol/L H₂O₂ and the effect of different concentration of H₂O₂ on BMSC was detected by Flow cytometry (FCM). And then cells were preconditioned with different concentration of H₂O₂. (FCM) was used to determine the protective role of H₂O₂ preconditioning on BMSC apoptosis, BMSC chromatin distribution changes were observed by Hoechst33324; BMSC Caspase-3 and Bcl-2 gene changes were detected by RT-PCR. 【Results】 Analysis of BMSC apoptosis by flow cytometry showed that H₂O₂ induced BMSC apoptosis in a dose-dependent manner, and pretreatment of the cells with low concentration of H₂O₂ prevented subsequent stimulation with high H₂O₂. RT-PCR results showed that preconditioning with low concentration of H₂O₂ reduced the BMSC Caspase-3 gene expression but increased Bcl-2 gene expression. 【Conclusion】 Preconditioning with low concentration of H₂O₂ has an adaptive role in BMSC, and its mechanism may be related to inhibit abnormal gene expression of Caspase-3 and increase the gene expression of Bcl-2.

Key words: hydrogen peroxide; apoptosis; BMSC

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2009, 30(4): 372-376]

收稿日期: 2008-02-21

基金项目: 2008 国家大学生创新训练计划项目; 中山大学学生业余科研项目

作者简介: 邓宇斌, 教授, 博士生导师, * 通讯作者, E-mail: dengyub@mail.sysu.edu.cn

骨髓间质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells, BMSC)是组织工程中最有应用前景的种子细胞之一,具有多种分化潜能,已被广泛应用于治疗缺血、缺氧损伤性疾病心肌梗死^[1-3](acute myocardial infarction, AMI)和缺血性脑病^[4-6]。缺血损伤引发的炎症反应和产生的大量氧自由基使移植后细胞的存活数量降低,如何提高移植后细胞的存活率是一个急待解决的问题。研究发现^[7-8],低浓度 ROS 对延迟心肌缺血再灌注损伤有保护作用,故本研究观察不同浓度的 H₂O₂ 预处理对骨髓间质干细胞的保护作用,并探讨其机制,为 BMSC 的移植治疗提供理论基础。

1 材料和方法

1.1 主要试剂

DMEM/F12(美国 Invitrogen 公司),胎牛血清(fetal bovine serum, FBS, Hyclone 公司),Hoechst 33342, Annexin V-FITC/PI 试剂盒,晶美生物工程有限公司。Caspase-3 基因上游引物:5'-ggacctgtgacactgaaaa-3',下游引物:5'-gcatccatcatcgtcag-3',扩增产物为 159 bp。bcl-2 基因上游引物:5'-cga ctttgagagatgccca-3',下游引物:5'-atgccggttcaggtactcag-3',扩增产物为 223 bp。 β -actin 基因上游引物:5'-TGTCACCAACTGGGACGATA-3',下游引物:5'-GGGGTGTGAAGGTCT-3',扩增产物为 165 bp。均由上海生工生物工程技术服务有限公司合成。

1.2 大鼠 BMSC 的分离和培养

取 60 ~ 80 g 的 SD 大鼠,断颈处死,无菌条件下取双侧股骨, PBS 液反复冲洗骨髓腔至变白。将冲洗液收集于离心管中, 1 000 r/min($r = 15$ cm)离心 5 min,加入 DMEM/F12 培养液 5 ~ 6 mL。重悬细胞于 25 cm² 培养瓶中, 37 °C、体积分数 5% CO₂、饱和湿度培养。每 3 d 换液 1 次,去除未贴壁细胞。每天在倒置相差显微镜下观察细胞的形态及生长情况。待贴壁细胞达 90% 融合时,用 2.5 g/L 胰蛋白酶消化贴壁细胞, 1:2 传代,本试验均选用第四代细胞。

1.3 实验分组

1.3.1 不同浓度 H₂O₂ 对 BMSC 凋亡的影响 细胞分别被暴露于 0, 50, 100, 200, 300, 400, 500 μ mol/L H₂O₂ 24 h。

1.3.2 低浓度 H₂O₂ 对 BMSC 凋亡的保护作用 细胞先分别用 20 μ mol/L, 50 μ mol/L, 100 μ mol/L H₂O₂ 预处理 24 h, 然后用 500 μ mol/L H₂O₂ 处理 24 h 诱导凋亡。

1.4 流式细胞术 Annexin V-FITC/PI 检测 H₂O₂ 对 BMSC 凋亡的影响

常规消化 BMSC,调整细胞浓度至 4×10^5 /mL,接种于 6 孔培养板, 3 mL/孔,培养过夜后,吸出培养液,常规消化 BMSC,分别离心,弃上清,用 4 °C 预冷的 PBS 洗细胞 1 次,分别用 100 μ L 结合缓冲液(1:4 稀释)重新悬浮细胞,按试剂盒说明加入 5 μ L Annexin V-FITC/PI 和 10 μ L 20 mg/L 的碘化丙啶溶液,混匀,置于室温避光孵育 15 min, FCM 分析凋亡情况。

1.5 Hoechst33324 染色

将 BMSC 接种在 6 孔板内的盖玻片上,各实验组按要求给以不同处理因素作用一定时间后,加入新鲜配制的 40 g/L 多聚甲醛于 4 °C 固定细胞 10 min,再加 5 mg/mL Hoechst33324 染色 10 min, PBS 液洗后,用封片液封片后荧光显微镜观察、摄片。正常细胞核出现均匀的强度荧光;细胞核如呈浓缩致密的固缩形态或颗粒状荧光,记为凋亡的细胞。

1.6 RT-PCR 检测 H₂O₂ 处理 BMSC 后 Caspase-3、Bcl-2 mRNA 水平的变化

收集各处理组和对照组细胞,按照 TRIzol Rengent 说明,提取总 RNA,定量后进行 RT-PCR DNA 扩增,产物以 β -actin 基因作内参照,采用 Gel Dos1000 凝胶分析仪扫描分析并相对定量。

1.7 统计学处理

计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,差异性分析采用 One-way ANOVA Test, $P < 0.05$ 被认为有统计学意义。统计软件为 SPSS11.0。

2 结果

2.1 不同浓度的 H₂O₂ 作用 BMSC 24 h 对细胞凋亡的影响

H₂O₂ 呈浓度依赖性诱导 BMSC 凋亡,流式细胞仪检测细胞的凋亡率分别为(2.1 \pm 0.5)%, (3.6 \pm 0.9)%, (7.3 \pm 0.8)%, (12.1 \pm 1.6)%, (31.4 \pm 2.5)%, (44.6 \pm 2.5)%和 (65.5 \pm 1.6)%。可见, 50 μ mol/L H₂O₂ 作用 BMSC 24 h,未引起 BMSC 显著

的凋亡 $P > 0.05$ ($n = 5$)。100, 200, 300, 400, 500 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 作用 BMSC 24 h, 明显引起 BMSC 的凋亡, 与对照组相比 $P < 0.05$; 而 500 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 作用 BMSC 24 h, 引起 50% 以上的 BMSC 细胞凋亡。

2.2 低浓度 H_2O_2 预处理对高浓度 H_2O_2 引起致死性凋亡的保护作用

凋亡结果显示: 50 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 预处理组所致的凋亡细胞数明显少于 500 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 单独作用 24 h 所引起的细胞凋亡数, 表明 50 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 预处理可以降低 500 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 所诱导的细胞凋亡 ($P < 0.01$); 100 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 预处理组 500 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 作用 24 h 引起的细胞凋亡无保护作用(图 1)。

2.3 Hoechst33324 染色结果

正常的 BMSC 染色质分布均匀, 为弥散均匀的低强度荧光, 可见正常的细胞器和完整的胞膜, 单独加 500 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 作用 24 h 后, 大量的胞核呈浓染致密的固缩形态或颗粒状荧光, 说明 500 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 作用 24 h 引起 BMSC 明显的凋亡(对照组, 图 2)。20 $\mu\text{mol/L}$ 、50 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 预处理 24 h 后, 恢复 12 h, 500 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 作用 24 h 所致的凋亡细胞数明显少于 500 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 单独作用 24 h 所引起的细胞凋亡数(图 2B、

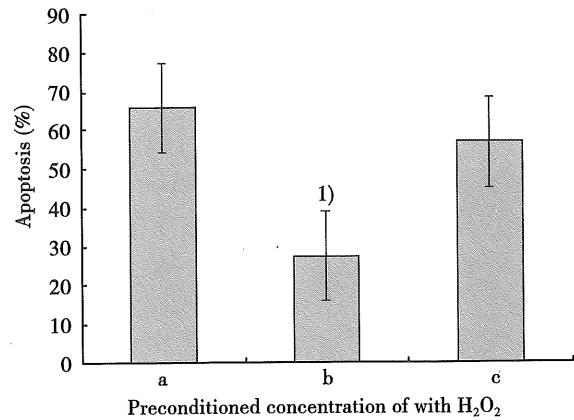


图 1 H_2O_2 预处理对高浓度 H_2O_2 引起致死性凋亡的保护作用

Fig.1 Cytoprotection of preconditioning with H_2O_2 in BMSCs

a: control; b: BMSCs were preconditioned with 50 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 for 24 h, followed by 12 h recovery, and subsequent exposure to 500 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 for 24 h; c: BMSCs were preconditioned with 100 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 for 24 h, followed by 12 h recovery, and subsequent exposure to 500 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 for 24 h; 1): $P < 0.01$, $n = 5$.

C), 表明低浓度预处理可以降低 500 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 所诱导的细胞凋亡; 100 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 预处理组对 500 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 作用 24 h 引起的细胞凋亡无保护作用(图 2D)。

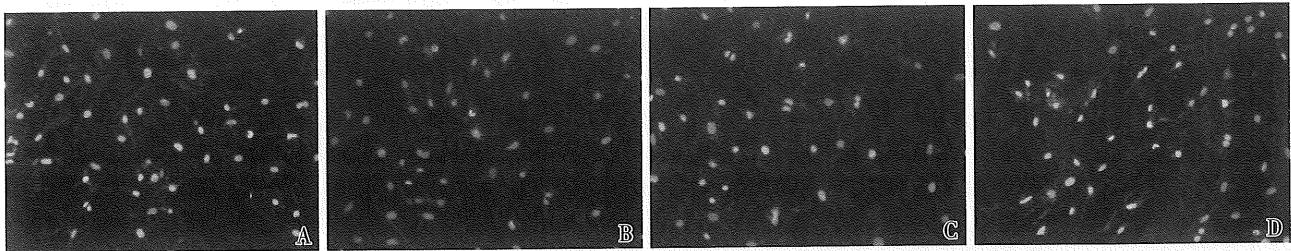


图 2 Hoechst33324 染色分析 H_2O_2 诱导的凋亡和 H_2O_2 预处理的保护作用

Fig.2 Hoechst33324 Nuclear staining for assessment of apoptosis and cytoprotection of preconditioning with H_2O_2

A: control; B: BMSCs were preconditioned with 20 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 for 24 h, followed by 12 h recovery, and subsequent exposure to 500 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 for 24 h; C: BMSCs were preconditioned with 50 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 for 24 h, followed by 12 h recovery, and subsequent exposure to 500 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 for 24 h; D: BMSCs were preconditioned with 100 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 for 24 h, followed by 12 h recovery, and subsequent exposure to 500 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 for 24 h; $\times 200$.

2.4 RT-PCR 检测 H_2O_2 预处理 BMSC 24 h 对 Caspase-3 和 Bcl-2 基因表达的影响

RT-PCR 技术检测 50 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 预处理 BMSC 24 h, 恢复 12 h 后, 500 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 处理 24 h, 检测 Caspase-3 和 Bcl-2 基因表达情况。结果显示与非预处理组相比 Caspase-3 mRNA 在 BMSC

中表达显著降低, 而在 Bcl-2 中表达显著增高(图 3)。

3 讨论

大量的研究资料表明, 各种预处理具有广泛

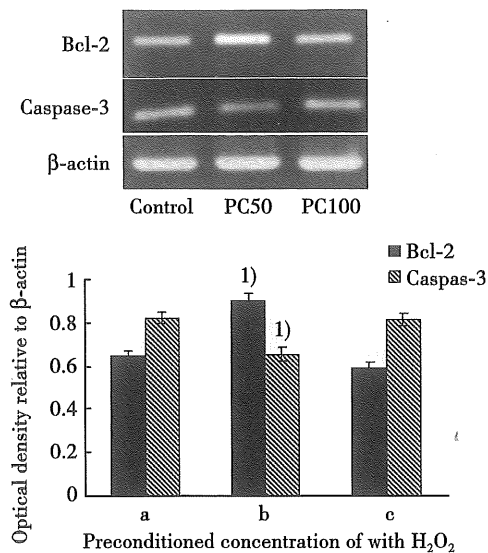


图3 H₂O₂ 预处理 BMSC 对 Caspase-3 和 Bcl-2 mRNA 表达的影响

Fig.3 Effect of H₂O₂ preconditioning on Bcl-2 and Caspase-3 expression in BMSCs

a: control; b: BMSCs were preconditioned with 50 μmol/L H₂O₂ for 24 h, followed by 12 h recovery, and subsequent exposure to 500 μmol/L H₂O₂ for 24 h; c: BMSCs were preconditioned with 100 μmol/L H₂O₂ for 24 h, followed by 12 h recovery, and subsequent exposure to 500 μmol/L H₂O₂ for 24 h; 1): $P < 0.05$

的适应性细胞保护作用。Gong 等^[9]研究提示,缺氧预处理通过活性氧的产生,激活了 ERK1/2 通路,发挥了心肌的延迟性保护作用;Colantuono 等^[10]报道,缺氧预处理,可以开放心肌线粒体 ATP-敏感的钙通道,产生活性氧发挥延迟性心肌保护作用。Liu 等^[11-12]研究表明,缺氧预处理可以降低细胞内超氧化物以及 H₂O₂ 的水平,可以对抗随后缺血诱导的细胞损伤。因此推断活性氧的产生很可能参与缺血预处理适应性细胞保护作用。

采用 Annexin V/PI 双染色法,流式细胞仪 (flow cytometry, FCM) 定性、定量检测凋亡细胞的数量。结果表明, H₂O₂ 处理 BMSC 24 h, 随着 H₂O₂ 处理浓度的增加 BMSC 的凋亡率逐渐增加, 这与高浓度 H₂O₂ 引起 BMSC 内产生过量氧自由基引起蛋白和 DNA 损伤有关^[13]。我们观察 H₂O₂ 预处理 BMSC 的适应性保护作用, 发现未经 50 μmol/L H₂O₂ 预处理的 BMSC, 经 500 μmol/L H₂O₂ 处理 24 h 后, 其凋亡率增加。经 50 μmol/L H₂O₂ 预处理的 BMSC, 其凋亡率显著降低 ($P < 0.01$), 经 100 μmol/L H₂O₂ 预处理的 BMSC, 其凋亡率与对照组

比无统计学差异 ($P > 0.01$), 说明 100 μmol/L H₂O₂ 预处理无保护作用 (图 1)。与 Tang 等^[14]的研究结果一致, 低浓度 H₂O₂ 预处理能够对抗高浓度 H₂O₂ 诱导的 BMSC 的凋亡。

在细胞凋亡发生的全过程中, 细胞膜一直保持完整, 但染色质出现凝聚、核裂解、胞质膜的发泡现象。经 Hoechst 荧光染色后, 在荧光显微镜下观察到呈浓缩致密的固缩形态或颗粒状荧光。50 μmol/L H₂O₂ 预处理 24 h 恢复 12 h 给予高浓度 500 μmol/L H₂O₂ 刺激组与未预处理组显示出很大的形态学差异, 50 μmol/L H₂O₂ 预处理组 BMSC 染色质分布均匀, 为弥漫均匀的低强度荧光 (图 2B)。未预处理组和 100 μmol/L H₂O₂ 预处理呈现出典型的凋亡特征, 大量的细胞核呈浓缩致密的固缩形态或颗粒状荧光 (图 2A、C), 进一步证实了低浓度 H₂O₂ 预处理能够对抗高浓度 H₂O₂ 诱导的 BMSC 的凋亡。

凋亡的发生是一个多种因素参与的复杂过程。各种凋亡刺激因素通过外源性的途径与细胞膜表面凋亡受体结合, 或通过内源性途径使线粒体释放氧自由基, 引起细胞凋亡, 但 Caspase-3 的激活是这两条途径引起凋亡的共同通路。Andoh 等^[15]研究硫氧还蛋白预处理神经母细胞瘤对氧化应激损伤的保护机制, 发现硫氧还蛋白是通过抑制细胞色素 C 的释放, 减少 Caspase-3 的激活, 增加 Bcl-2 的表达等机制发挥抗氧化应激损伤的。Bcl-2 的过表达一直被认为与保护细胞抗各种致死性的刺激引起的凋亡有关, Bcl-2 抗凋亡作用与调节过氧化应激通路有关。与此观点一致的是 Bcl-2 减少细胞内活性氧的产生降低凋亡的数量。也有研究^[16]报道 Bcl-2 能够减少各种致死性刺激产生的活性氧的量, 减少活性氧引起的 DNA 和/或蛋白的损伤。我们的结果表明, 在 mRNA 水平, H₂O₂ 预处理能明显降低 Caspase-3 表达并增加 Bcl-2 的表达, 减少高浓度 H₂O₂ 引起的细胞凋亡, 与 Leak^[17]、Obame 等^[18]报道一致, H₂O₂ 预处理的适应性细胞保护与 Caspase-3 降低和 Bcl-2 的增高有关。

BMSC 以其自身的优势和向各胚层细胞分化的可塑性, 被认为是各种缺血缺氧性疾病治疗的理想种子细胞。但目前大多数 BMSC 移植研究中所遇到的主要问题是: 缺血缺氧损伤区大量炎症因子和氧自由基的聚集导致移植后的 BMSC 存活

率低,使细胞治疗的效果大大降低并限制其应用范围。本文通过探讨低浓度 H_2O_2 预处理对高浓度 H_2O_2 引起骨髓间质干细胞凋亡的保护机制,为提高 BMSC 用于移植治疗细胞的存活率提供新的理论基础。

参考文献:

- [1] Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, et al. Bone marrow stem cells regenerate infarcted myocardium [J]. *Pediatr Transplant*, 2003,7(3):86-88.
- [2] 王彤,黄子通,符岳,等.心肌梗死后骨髓间充质干细胞治疗改进心功能及心肺复苏结果的研究 [J]. *中山大学学报:医学科学版*,2007,28(5):529-534.
- [3] 潘兴华,贺斌,庞荣清,等.猴脑血管缺血模型复制及骨髓间充质干细胞移植治疗 [J]. *热带医学杂志*, 2006,6(05):533-536,532.
- [4] Isele NB, Lee HS, Landshamer S, et al. Bone marrow stromal cells mediate protection through stimulation of PI3-K/Akt and MAPK signaling in neurons [J]. *Neurochem Int*, 2007,50(1):243-250.
- [5] Chang YC, Shyu WC, Lin SZ, et al. Regenerative therapy for stroke [J]. *Cell Transplant*, 2007,16(2):171-181.
- [6] Wang Y, Haider HKh, Ahmad N, et al. Evidence for ischemia induced host-derived bone marrow cell mobilization into cardiac allografts [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2006,41(3):478-487.
- [7] Zhang T, Somasundaram R, Berencsi K, et al. CXC chemokine ligand 12 (stromal cell-derived factor 1 alpha) and CXCR4-dependent migration of CTLs toward melanoma cells in organotypic culture [J]. *J Immunol*, 2005,174(9):5856-5863.
- [8] Haroun-Bizri S, Khoury SS, Chehab IR, et al. Does isoflurane optimize myocardial protection during cardiopulmonary bypass [J]. *J Cardiothorac Vasc Anesth*, 2001,15(4):418-421.
- [9] Gong KZ, Zhang ZG, Li AH, et al. ROS-mediated ERK activation in delayed protection from anoxic preconditioning in neonatal rat cardiomyocytes [J]. *Chin Med J (Engl)*, 2004,117(3):395-400.
- [10] Colantuono G, Tiravanti EA, Di Venosa N, et al. Hyperoxia confers myocardial protection in mechanically ventilated rats through the generation of free radicals and opening of mitochondrial ATP-sensitive potassium channels [J]. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 2008,35(1):64-71.
- [11] Crestanello JA, Lingle DM, Kamelgard J, et al. Ischemic preconditioning decreases oxidative stress during reperfusion: a chemiluminescence study [J]. *J Surg Res*, 1996,65(1):53-58.
- [12] Liu J, Narasimhan P, Yu F, et al. Neuroprotection by hypoxic preconditioning involves oxidative stress-mediated expression of hypoxia-inducible factor and erythropoietin [J]. *Stroke*, 2005,36(6):1264-1269.
- [13] Sachdev S, Davies KJ. Production, detection, and adaptive responses to free radicals in exercise [J]. *Free Radic Biol Med*, 2008,44(2):215-223.
- [14] Tang XQ, Feng JQ, Chen J, et al. Protection of oxidative preconditioning against apoptosis induced by H_2O_2 in PC12 cells: mechanisms via MMP, ROS, and Bcl-2 [J]. *Brain Res*, 2005,1057(1-2):57-64.
- [15] Andoh T, Chock PB, Chiueh CC, et al. The roles of thioredoxin in protection against oxidative stress-induced apoptosis in SH-SY5Y cells [J]. *J Biol Chem*, 2002,277(12):9655-9660.
- [16] Bruce-Keller AJ, Begley JG, Fu W, et al. Bcl-2 protects isolated plasma and mitochondrial membranes against lipid peroxidation induced by hydrogen peroxide and amyloid beta-peptide [J]. *J Neurochem*, 1998,70(1):31-39.
- [17] Leak RK, Liou AK, Zigmond MJ, et al. Effect of sublethal 6-hydroxydopamine on the response to subsequent oxidative stress in dopaminergic cells: evidence for preconditioning [J]. *J Neurochem*, 2006,99(4):1151-1163.
- [18] Obame FN, Zini R, Souktani R, et al. Peripheral benzodiazepine receptor-induced myocardial protection is mediated by inhibition of mitochondrial membrane permeabilization [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2007,323(1):336-345.

(编辑 孙慧兰)