

骨质疏松引起的椎体压缩性骨折,包括新鲜椎体骨折或保守治疗失败的陈旧性骨质疏松性椎体压缩骨折。(2)骨质疏松性椎体压缩骨折不能耐受长期卧床的患者。(3)椎体病变使骨质破坏致椎体骨折患者。PKP手术的禁忌证包括:①椎体骨折伴神经症状或椎体后壁不完整伴椎管狭窄者;②凝血功能异常或心肺功能差不能耐受手术者;③椎体压缩程度>75%以上者。术后12h VAS同术前相比明显下降,JOA评分升高显著,说明患者疼痛缓解明显,腰背功能明显改善,同时笔者通过对Cobb角的变化分析发现,椎体后凸畸形矫正明显,椎体后凸成形手术可以一定程度上重建腰椎的生理弧度,对局部稳定性意义重大,这些都说明该手术方式改善临床症状的有效性。经过随访笔者发现,患者术后12h VAS、JOA评分及Cobb角的变化与末次随访比较差异无显著性意义,这说明经过PKP治疗后患者的临床疗效稳定,腰背部的功能持续维持,临床疗效满意。总之,PKP对于老年骨质疏松性椎体压缩骨折患者是一种安全有效的治疗手段。

参考文献

- 1 Anonymous. Consensus development conference, diagnosis, prophylaxis and treatment of osteoporosis[J]. Am J Med, 1993, 94(12): 646-650

- 2 Song BK, Eun JP, Oh YM. Clinical and radiological comparison of unipedicular versus bipedicular balloon kyphoplasty for the treatment of vertebral compression fractures [J]. Osteoporosis Int, 2009, 20(10): 1717-1723
- 3 Svejme O, Hhlborg HG, Nilsson JA, et al. Early menopause and risk of osteoporosis, fracture and mortality: a 34-year prospective observational study in 390 women [J]. 2012, 19(7): 810-816
- 4 王海滨,朱六龙,何齐芳,等. 椎体后凸成形术治疗老年性陈旧性椎体压缩性骨折的近期疗效分析[J]. 医学研究杂志, 2012, 41(9): 152-155
- 5 梁绛宸,张智海,王冉东,等. 椎体后凸成形术在上中胸椎骨质疏松压缩性骨折治疗中的临床应用研究[J]. 中国骨质疏松杂志, 2013, 1(7): 718-720
- 6 海涌,陈志明,彭军,等. 椎体后凸成形术治疗骨质疏松性椎体压缩骨折[J]. 中国矫形外科杂志, 2005, 13(19): 1450-1452
- 7 Rao RD, Singrakhia MD. Painful osteoporotic vertebral fracture, pathogenesis, evaluation, and roles of vertebroplasty and kyphoplasty in its management [J]. J Bone Joint Surg: Am, 2003, 852A(10): 2010-2022
- 8 桑林朝,康乐,黄晨,等. 椎体成形术临床应用1080例[J]. 中华创伤杂志, 2014, 30(11): 1117-1121
- 9 李建哲,贾全章. 椎体成形术治疗骨质疏松性椎体压缩骨折的研究进展[J]. 中国老年学杂志, 2015, 35(22): 6626-6629
- 10 袁文,谢宁. 椎体成形术与后凸成形术的临床应用及相关问题[J]. 中国骨伤, 2010, 23(10): 726-728

(收稿日期:2016-03-30)

(修回日期:2016-05-11)

沉默 USP39 对食管癌细胞增殖的影响

顾怡雯 江伟骏 李锦伟

摘要 目的 探索食管癌细胞 EC9706 及人正常食管上皮细胞 HEEC 中 USP39 分子的表达差异及沉默 USP39 对食管癌细胞 EC9706 增殖的影响。**方法** 利用 qRT-PCR 及 Western blot 法检测细胞中 USP39 表达情况;设计并合成 USP39 的 siRNA (USP39-siRNA)及对照 (USP39-NC)转染食管癌细胞 EC9706 细胞,利用 qRT-PCR、Western blot 法检测 EC9706 细胞中 USP39 的表达变化;MTT、平板克隆实验检测 EC9706 细胞的增殖。**结果** USP39 在 EC9706 细胞中的表达高于人正常食管上皮细胞 HEEC 的表达,USP39-siRNA 下调了 EC9706 细胞中 USP39 基因水平与蛋白水平的表达,并抑制了细胞的增殖能力。**结论** USP39-siRNA 能够下调 USP39 的表达,并有效抑制食管癌细胞 EC9706 细胞的增殖,为以 USP39 为靶点的食管癌基因治疗奠定基础。

关键词 USP39 EC9706 细胞 增殖 食管癌

中图分类号 R735

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2016.12.021

Effect of Silencing UAP39 Expression on the Proliferation of Esophagus Cancer Cells. Gu Yiwen, Jiang Weijun, Li Jinwei. Tongren Hospital, Shanghai Jiao tong University School of Medicine, Shanghai 200335, China

作者单位:200335 上海交通大学医学院附属同仁医院老年科(顾怡雯、李锦伟),消化内窥镜室(江伟骏)

通讯作者:顾怡雯,电子信箱:GYw2015zxc@163.com

Abstract Objective To observe the different expression of USP39 in esophagus cancer cell and normal esophageal epithelial cells, and study the effect on esophagus cancer cell proliferation by knocked down the expression of USP39. **Methods** siRNA fragments (USP39 - siRNA) and USP39 - NC were designed and synthesized according to gene sequences of USP39 and transfected to the esophagus cancer cells. The mRNA and protein expression levels of USP39 were detected using qRT - PCR and western blot respectively; cell proliferation was detected by MTT and colony formation assay in EC9706 cells. **Results** The mRNA and protein expression levels of USP39 was higher in EC9706 cells than in HEEC cells, and the expression level of USP39 was reduced by USP39 - siRNA in the EC9706 cells, the proliferation of EC9706 cells decreased after transfected with USP39 - siRNA. **Conclusion** USP39 - siRNA could down - regulate the expression of USP39 and inhibit the proliferation of EC9706 cells, which is a theory foundation for USP39 as a gene target therapy of esophagus cancer.

Key words USP39; EC9706 cells; Proliferation; Esophagus cancer

食管癌是世界范围内广泛发病的消化系统肿瘤之一, 发生率在肿瘤中位居第 9 位, 因肿瘤死亡的病因中位居第 6 位, 男性发生率比女性高。尽管目前联合手术治疗、放射治疗、化学药物治疗及生物治疗等多种手段对食管癌进行综合治疗, 但患者的预后仍然不理想^[1]。因此探索食管癌的致病基因、发病机制, 寻找食管癌的关键致病分子具有重要意义。

泛素特异性蛋白酶 39 (ubiquitin specific protease 39, USP39) 是一种 65kDa 的 SR 相关蛋白, 属于去泛素化酶 (deubiquitinating enzymes, DUBs) 家族成员之一, 在人类细胞中参与剪接体的组装^[2]。研究显示 USP39 在多种肿瘤组织中异常过表达, 沉默 USP39 表达可以抑制乳腺癌、肝癌、口腔鳞状细胞癌等细胞的增殖^[3-5]。但 USP39 在食管癌中的作用尚未有研究报道。本实验通过检测食管癌细胞 EC9706 及人正常食管上皮细胞 HEEC 中 USP39 分子的表达差异, 并通过 RNA 干涉技术下调食管癌细胞 EC9706 中 USP39 分子的表达, 观测其对 EC9706 细胞增殖的影响, 为寻找食管癌发病的致病因子及将 USP39 分子作为食管癌基因治疗靶点提供理论基础。

材料与方法

1. 材料: RIPA 细胞裂解液购自碧云天公司; 山羊抗兔及山羊抗小鼠的单克隆二抗购自 Santa 公司; 蛋白定量试剂盒购自碧云天公司; 兔抗人 USP39 单克隆抗体、鼠抗人 β - actin 单克隆内参抗体购自美国 Abcam 公司; 化学发光液购自美国 Millipore 公司; TRIzol 细胞裂解液购于北京百奥森泰生物技术有限公司; RNA 反转录试剂盒购自 TaKaRa 公司; 转染试剂盒购自美国 Invitrogen 公司; MTT 购自碧云天公司; EC9706 细胞及人正常食管上皮 HEEC 细胞购自上海细胞库。

2. 方法: (1) USP39 - siRNA 的设计、合成: 按照 siRNA 靶点的设计规则, 根据 USP39 的序列, 利用 In-

vitrogen 公司的设计软件, 设计 USP39 的 siRNA 及对照序列, USP39 的对照序列及 siRNA 序列由上海吉玛科技有限公司合成, 分别命名为 USP39 - NC、USP39 - siRNA。(2) 细胞培养和转染: 用 DMEM 培养液 (含 100ml/L 胎牛血清) 培养 EC9706 细胞及人正常食管上皮 HEEC 细胞, 于培养箱 (37℃、50ml/L CO₂) 中培养细胞。待细胞达到 70% ~ 80% 密度后, 将合成的 USP39 - NC、USP39 - siRNA 按照脂质体试剂说明操作经 Lipofectamine2000 转入 EC9706 细胞中。转染后细胞分别命名为 USP39 - NC 组、USP39 - siRNA 组。(3) qRT - PCR 检测 USP39 mRNA 水平表达情况: 采用 qRT - PCR 技术进行 USP39 基因表达情况的检测。收集转染 USP39 - NC、USP39 - siRNA 后 48h 的 EC9706 细胞, 利用 TRIzol 细胞裂解液裂解细胞, 提取 USP39 - NC 组、USP39 - siRNA 组细胞总 RNA, 按照反转录试剂说明将 RNA 反转录为 cDNA。USP39 定量 PCR 引物如下: 上游: 5' - GCCAGCAGAAGAAAA GAGC - 3', 下游: 5' - GCCATTGAACTTAGCCAGGA - 3'。 β - actin 作为内参基因, 引物序列如下: 上游: 5' - GTGGACATCCGCAAAGAC - 3', 下游: 5' - AAAGGGTGTAAACGCAACTA - 3'。由华大基因合成引物序列。实验条件为: 预变性 95℃ 4min, 95℃ 15s, 61℃ 35s, 退火后收集荧光, 共 39 个循环, 每组设复孔 3 个。将所得数据绘制成图。(4) Western blot 法检测 USP39 蛋白表达情况: 收集转染 USP39 - NC、USP39 - siRNA 后 48h 的 EC9706 细胞, 无菌生理盐水洗涤细胞 2 次, 离心后弃掉上清液, 保留细胞沉淀, 并向其中加入 100 μ l 蛋白裂解液, 放于冰上裂解 25min, 12000 $\times g$ 、4℃ 条件下离心 18min, 取部分蛋白上清蛋白定量, 其余上清加入上样缓冲液, 100℃ 沸水中煮 8min, 取处理变性后的蛋白样品 30 μ g, 用 SDS - PAGE (100g/L) 电泳分离。将分离后的蛋白电转移至 PVDF 膜上。用含脱

脂奶粉(50g/L)的 PBS 封闭液室温下摇晃 1.5h。分别加入 USP39(1:1000)及内参抗体(1:2000),4℃ 孵育过夜,用 PBST 洗涤 4 次,加入二抗(1:1000)后室温下孵育 2.5h,PBST 洗涤 4 次。加入显色剂显色、成像。

(5) MTT 检测 EC9706 细胞增殖:取 EC9706 细胞,用胰酶消化细胞,以 $800 \times g$ 离心,弃掉上清,保留细胞沉淀并向其中加入培养液,制成细胞浓度为 2.5×10^4 ml 单细胞悬液,以 200 微升/孔的浓度接种 96 孔细胞培养板。待细胞贴壁后,弃去培养液,按脂质体说明步骤进行细胞转染,USP39 - NC 组、USP39 - siRNA 组细胞各重复 8 个复孔,共培养 5 个 96 孔板。细胞培养箱中培养,分别于 1~5 天每天取出一板进行检测,每天于实验结束前 4h 取出一 96 孔板,向细胞中加入 MTT(质量分数为 5mg/ml),每孔 $20 \mu\text{l}$,继续放入培养箱培养 4h,轻轻吸掉上清液,向每孔中加入 $150 \mu\text{l}$ 的 DMSO,震动 15min 使 MTT 的还原产物溶解,在 490nm 处测定各孔的吸光度值。

(6) 软琼脂克隆实验检测 EC9706 细胞增殖:EC9706 细胞转染 USP39 - NC、USP39 - siRNA 48 h 后,用胰酶消化各组细胞,无菌生理盐水洗 2 遍,用 DMEM 培养液(含有 100ml/L 胎牛血清)调整细胞密度至 5×10^3 细胞/L,制备浓度分别为 1.2%、0.7% 的琼脂糖液,经高压灭菌处理后,于 40℃ 孵箱中保持琼脂糖液处于液体状态,按 1:1 比例将 $2 \times$ DMEM 培养基(含有 200ml/L 的胎牛血清)与 1.2% 的琼脂糖充分混合后,将 3ml 上述混合液注入 6cm 皿中,凝固后作为底层的琼脂,同样按 1:1 的比例,将 $2 \times$ DMEM 培养基和 0.7% 的琼脂糖混合后,并向其中加入细胞悬液 0.2ml 充分混匀,将其铺在底层琼脂上层,凝固后形成双层琼脂。并放入细胞培养箱中培养。2 周后在倒置显微镜下计数细胞克隆数。

3. 统计学方法:利用 SPSS 20.0 进行分析,数据采用均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,各组间比较采用方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. USP39 在 EC9706 细胞中高表达:收集 EC9706 及 HEEC 细胞,分别提取细胞的总 RNA 及总蛋白,利用 qRT - PCR 技术及 Western blot 法检测细胞中 USP39 在 mRNA 及蛋白水平的表达情况,结果显示,与人正常食管上皮细胞 HEEC 相比,在 mRNA 水平,USP39 在 EC9706 细胞中明显高表达(图 1, $P < 0.05$);同样,在蛋白水平,USP39 在 EC9706 细胞中明显高表达(图 2)。

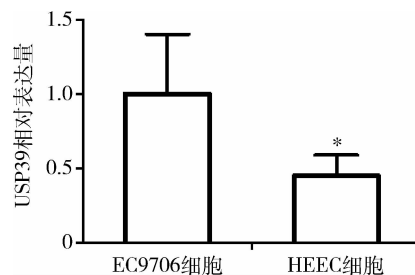


图 1 qRT - PCR 检测细胞中 USP39 基因的 mRNA 水平表达

* $P < 0.05$

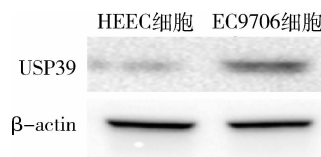


图 2 Western blot 法检测细胞中 USP39 基因的蛋白水平表达

2. USP39 - siRNA 沉默 EC9706 细胞中 USP39 的 mRNA 及蛋白水平表达:USP39 - siRNA 及对照转染 EC9706 后 48h,提取细胞总 RNA、总蛋白,通过 qRT - PCR 检测 USP39 基因表达水平,通过 Western blot 法检测 USP39 蛋白表达水平,发现较 USP39 - NC 组,USP39 - siRNA 组 USP39 在 mRNA 水平表达明显下调(图 3, $P < 0.05$);同样,USP39 - siRNA 组 USP39 蛋白水平表达明显受到抑制(图 4)。

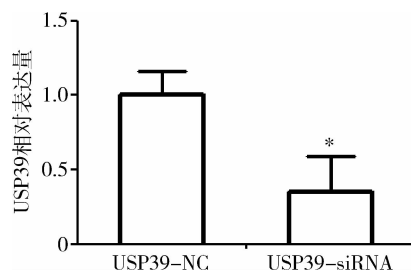


图 3 qRT - PCR 检测各组细胞 USP39 mRNA 水平表达变化

* $P < 0.05$

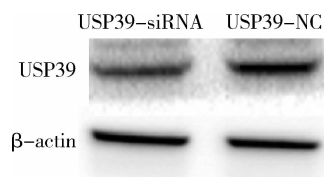


图 4 Western blot 法检测各组细胞 USP39 蛋白水平变化

3. MTT 检测 USP39 - siRNA 对 EC9706 细胞增殖

的影响:MTT 实验显示,与 USP39 - NC 组相比,从检测后第 3 天开始,USP39 - siRNA 组细胞的增殖明显被抑制(图 5)。

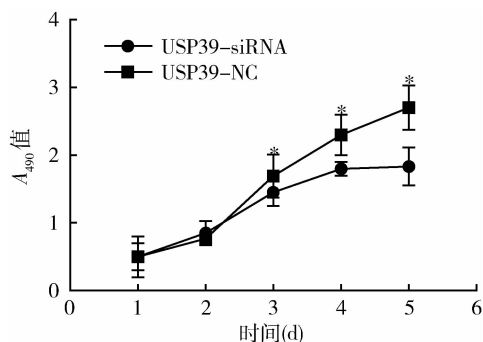


图 5 MTT 检测 USP39 - siRNA 对细胞增殖的影响

4. 软琼脂克隆实验检测 USP39 - siRNA 对 EC9706 细胞增殖的影响: USP39 - siRNA 及对照序列转染 EC9706 细胞 48h 后,通过软琼脂克隆实验检测 USP39 - siRNA 对 EC9706 细胞增殖的影响,结果显示转染 USP39 - siRNA 的细胞增殖能力明显受到抑制(图 6、图 7)。

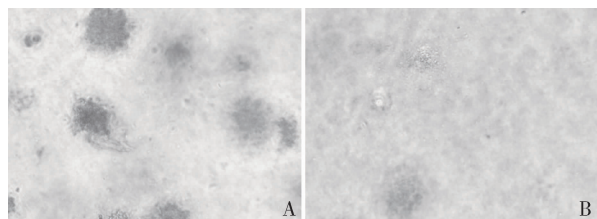


图 6 软琼脂克隆实验检测 USP39 - siRNA 对细胞增殖的影响 (×100)

A. USP39 - NC; B. USP39 - siRNA

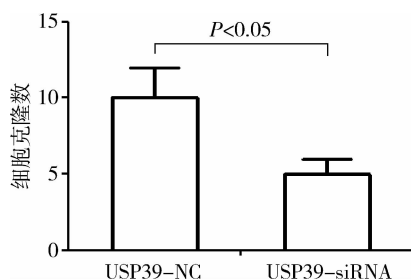


图 7 软琼脂克隆实验的统计数据图

讨 论

食管癌是指发生在食管黏膜上皮细胞的消化系统恶性肿瘤,我国是高发国家。中、下段食管癌居多,分别占食管癌的 40% 左右。食管癌以进行性的吞咽困难,咽下疼痛,食物反流等为主要临床特征。老年

人为高发人群,我国食管癌患者约 80% 在 50 岁以上发病。男性患者人数明显高于女性患者。全世界每年死于食管癌的患者大约有 20 万例,而我国每年死于食管癌的人数近 15 万例。由此可见,食管癌严重影响了我国人民的健康和生命。因此寻找食管癌的致病基因,探索食管癌的发病机制具有重要意义。

细胞的增殖以及克隆形成能力是肿瘤发生、发展的重要因素。既往研究发现沉默乳腺癌 MCF - 7 细胞中 USP39 的表达可以明显的抑制细胞的增殖及克隆形成能力,此外,乳腺癌细胞的细胞周期被阻滞在 G₀/G₁ 期,细胞的凋亡明显增加^[3]。Pan 等^[6]探索了 USP39 在肝癌中的作用,发现沉默肝癌细胞中 USP39 的表达,SMC - 7721 细胞的增殖明显受到抑制,细胞的凋亡明显增加,而细胞周期被阻滞在 G₂/M 期。甲状腺髓样细胞癌中 USP39 的表达下调同样可以抑制肿瘤细胞的增殖、克隆形成能力,细胞 G₂/M 期被阻滞, G₂/M 期相关蛋白 Cyclin B1 及 CDK1 明显下调^[7]。此外,有研究显示,沉默细胞中 USP39 的表达,Western blot 法检测显示 Bcl - 2 家族的促凋亡蛋白 Bax 表达上调,凋亡相关蛋白 caspase - 9、caspase - 3 表达上调^[8]。笔者研究发现,沉默食管癌细胞中 USP39 的表达肿瘤细胞的增殖及克隆形成能力同样受到明显抑制。说明 USP39 很可能在食管癌中通过促进细胞的增殖促进肿瘤的发展。

本研究通过检测食管癌细胞及人正常食管上皮细胞中 USP39 的表达,发现在食管癌细胞中 USP39 高表达;通过 RNAi 技术沉默食管癌细胞中 USP39 的表达,利用 MTT、软琼脂克隆实验检测 USP39 对食管癌细胞增殖的影响,证实沉默 USP39 表达可以明显抑制食管癌细胞的增殖。初步证实了 USP39 通过促进食管癌的增殖促进食管癌的发展。

参考文献

- Lin J, Kang M, Chen S, *et al.* Feasibility and strategy for left tracheo-bronchial lymph node dissection in thoracoscopic esophageal cancer surgery[J]. *Thorac Cancer*, 2016, 7(2): 199 - 206
- Rios Y, Melmed S, Lin S, *et al.* Zebrafish usp39 mutation leads to rbl mRNA splicing defect and pituitary lineage expansion[J]. *PLoS Genet*, 2011, 7(1): e1001271
- Wang H, Ji X, Liu X, *et al.* Lentivirus - mediated inhibition of USP39 suppresses the growth of breast cancer cells in vitro[J]. *Oncol Rep*, 2013, 30(6): 2871 - 2877
- Yuan X, Sun X, Shi X, *et al.* USP39 promotes the growth of human hepatocellular carcinoma in vitro and in vivo[J]. *Oncol Rep*, 2015, 34(2): 823 - 832

(下转第 104 页)

须及时终止妊娠,而此时胎儿尚未足月,易发生早产儿的不良结局,比如肺发育不成熟、存活率低、预后差等,故临床不宜推广^[7-9]。笔者医院采用足月臀位外倒转术,胎儿已发育成熟,如果发生上述并发症,已做好剖宫产的准备,可及时手术,对母儿无不良影响。

3. 影响臀位外倒转术成功的因素探讨: Kok等^[11-12]报道,经产妇、胎盘附着在子宫后壁、完全臀位均可提高外倒转的成功率,而孕妇肥胖、胎盘附着在子宫前壁、宫颈扩张等易导致外倒转术失败。而李洁等^[13]报道,单臀位外倒转术的成功率高于不完全臀位(77.1% vs 45.5%),但初产妇与经产妇(67.7% vs 80.0%)、前壁胎盘与非前壁胎盘(61.0% vs 74.2%)实施外倒转术的成功率比较,差异均无统计学意义,提示初产妇或胎盘附着在子宫前壁的孕妇均可试行外倒转术纠正胎位。

本研究结果显示,脐带长度是影响外倒转成功的主要因素。倒转成功的病例脐带长度在46~66cm,平均52.67cm,过短或者过长均不容易倒转成功。脐带过短者行外倒转术容易引起胎盘早剥,导致胎儿窘迫,或者倒转阻力较大,不易成功。脐带过长则可能存在脐带绕颈,或倒转过程中,脐带缠绕胎儿身体,导致脐带受压,影响胎儿血供,导致胎儿窘迫。由于本研究病例数限制,其他因素如羊水指数、脐带绕颈与否、新生儿体重、孕妇体重指数、是否使用宫缩抑制剂等,统计学结果均无意义,需大样本量的进一步研究。

综上所述,对于单胎臀位的孕妇,笔者在决定行外倒转术之前,应充分评估相关因素,严格筛选患者,掌握其适应证和禁忌证,提高外倒转的成功率。对于前置胎盘、胎儿窘迫、骨盆狭窄、胎儿过大估计不能经阴道分娩者,应禁止行外倒转术。术前、术中、术后应

严密监测胎儿情况,减少并发症。

参考文献

- James DK, Steer PJ, Weiner CP, *et al.* 高危妊娠[M]. 3版. 北京:人民卫生出版社, 2008:1187-1189
- Cunningham FG, Leveno KJ, Bloom SL, *et al.* Williams obstetrics [M]. 23rd ed. New York: McGraw-Hill, 2010:541
- 侯磊, 张为远. 2011年全国剖宫产现状调查. 中华医学会第十次全国妇产科学术会议产科会场(产科学组、妊娠症学组)论文汇编[C]. 2012
- Tan JM, Macario A, Carvalho B, *et al.* Cost-effectiveness of external cephalic version for term breech presentation [J]. BMC Pregnancy Childbirth, 2010, 10:3
- 沈瑶, 林建华, 林其德, 等. 我国部分地区剖宫产率影响因素和特征分析[J]. 实用妇产科杂志, 2011, 27(3): 183-187
- 郭政, 张润香, 郭皓靖, 等. 剖宫产率及剖宫产指征20年回顾[J]. 中国妇幼保健, 2012, 27(20): 3089-3092
- 谢幸, 苟文丽. 妇产科学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2014: 202-205
- 邓新琼, 覃晓慧. 多学科联合对足月单胎臀位外倒转43例临床分析[J]. 现代妇产科进展, 2016, 25(1): 54-55
- 蔡雁, 蔡贞玉. 安全降低剖宫产率系列: 多学科合作的妊娠36周后外倒转术[J]. 妇产与遗传: 电子版, 2015, 5(1): 1-7
- 杨玉英, 刘锡梅. B超监测下臀位外倒转术168例临床分析[J]. 山东医药, 2002, 42(5): 48-49
- Kok M, Cnossen J, Gravendeel L, *et al.* Clinical factors to predict the outcome of external cephalic version: a meta analysis [J]. Am J Obstet Gynecol, 2008, 199: e1-e7
- Kok M, Cnossen J, Gravendeel L, *et al.* Ultrasound factors to predict the outcome of external cephalic version: a meta analysis [J]. Ultrasound Obstet Gynecol, 2009, 33: 76-84
- 李洁, 孙凤英. 臀围外倒转术的成功率及其影响因素[J]. 中华围产医学杂志, 2014, 17(3): 169-172

(收稿日期: 2016-08-03)

(修回日期: 2016-09-13)

(上接第79页)

- Li KY, Zhang J, Jiang LC, *et al.* Knockdown of USP39 by lentivirus-mediated RNA interference suppresses the growth of oral squamous cell carcinoma [J]. Cancer Biomark, 2016, 16(1): 137-144
- Pan Z, Pan H, Zhang J, *et al.* Lentivirus mediated silencing of ubiquitin specific peptidase 39 inhibits cell proliferation of human hepatocellular carcinoma cells in vitro [J]. Biol Res, 2015, 48: 18
- An Y, Yang S, Guo K, *et al.* Reduced USP39 expression inhibits ma-

lignant proliferation of medullary thyroid carcinoma in vitro [J]. World J Surg Oncol, 2015, 13(1): 255

- Bao W, Liu R, Wang Y, *et al.* PLGA-PLL-PEG-Tf-based targeted nanoparticles drug delivery system enhance antitumor efficacy via intrinsic apoptosis pathway [J]. Int J Nanomedicine, 2015, 10: 557-566

(收稿日期: 2016-04-17)

(修回日期: 2016-05-02)