

· 临床论著 ·

二至天癸方对 IVF-ET 患者颗粒细胞凋亡的影响

连 方¹ 相 珊²

摘要 **目的** 观察二至天癸方干预调节 PI3K/Akt 信号通路关键效应分子 p-Akt、PI3K 及与通路相关的 Bad 水平对肾气虚体外受精-胚胎移植(IVF-ET)患者卵细胞质量的影响。**方法** 选取行 IVF-ET 的肾气虚不孕症患者 80 例,按照随机数字表法分为治疗组(二至天癸方结合 IVF-ET 治疗),安慰剂组(安慰剂颗粒结合 IVF-ET 治疗),每组 40 例,另选取 40 名因男方因素行 IVF-ET 的女性志愿者为健康对照组(安慰剂颗粒结合 IVF-ET 治疗)。3 组患者均于促性腺激素释放激素激动剂(GnRH-a)降调节的前一周开始加服二至天癸方或安慰剂颗粒至人绒毛膜促性腺激素(HCG)注射日停药。观察 3 组患者临床妊娠率、颗粒细胞凋亡率。Western blot 法检测 PI3K/Akt 信号转导通路 p-Akt、PI3K、Bad 蛋白水平。**结果** 与健康对照组比较,安慰剂组 PI3K、p-Akt 蛋白表达量降低,Bad 蛋白表达量升高($P < 0.05$, $P < 0.01$);与安慰剂组比较,治疗组 PI3K、p-Akt 蛋白表达量升高,Bad 蛋白表达量降低($P < 0.05$, $P < 0.01$)。与健康对照组比较,健康对照组及治疗组卵巢颗粒细胞凋亡率均降低,临床妊娠率增高($P < 0.05$, $P < 0.01$)。**结论** 二至天癸方可能是通过 PI3K/Akt 信号转导通路,下调 Bad 因子表达,抑制颗粒细胞凋亡,从而提高 IVF-ET 患者卵细胞质量,最终改善肾气虚不孕症患者的 IVF-ET 结局。

关键词 二至天癸方;肾气虚;PI3K/Akt 信号转导通路;体外受精-胚胎移植

Effect of Erzhi Tiangui Decoction on Granulosa Cells Apoptosis in IVF-ET Patients with Shen-qi Deficiency LIAN Fang and XIANG Shan *Reproductive and Genetic Center of Integrated Traditional and Western Medicine, Affiliated Hospital, Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan (250011); 2 First Clinical Medical College, Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan (250001)*

ABSTRACT **Objective** To observe the effect of Erzhi Tiangui Decoction (EZTGD) on *in vitro* fertilization and embryo transfer (IVF-ET) patients with Shen-qi deficiency by intervention of p-Akt、PI3K、Bad protein in PI3K/Akt signaling pathway. **Methods** Totally 80 infertile patients with Shen-qi deficiency undergoing IVF-ET were randomly assigned to the EZTGD treatment group (40 cases, EZTGD combined with IVF-ET) and the placebo group (40 cases, placebo combined with IVF-ET), and another 40 female volunteers due to spouse problem as the control group (placebo combined with IVF-ET) were recruited. All of them were treated from the day of gonadotropin-releasing hormone agonist (GnRH-a) down regulation to the human chorionic gonadotropin (HCG) injection day. The clinical pregnancy rate and the apoptosis rate of granulosa cells were observed. The expression of p-Akt、PI3K、Bad were detected by Western-blot. **Results** Compared with the control group, the protein expression of PI3K, p-Akt in the placebo group were decreased, the protein expression of Bad was increased ($P < 0.05$, $P < 0.01$). Compared with the placebo group, the protein expression of PI3K, p-Akt in granulosa cells of the EZTGD treatment group were increased, while the protein expression of Bad was decreased ($P < 0.05$, $P < 0.01$). Compared with the placebo group, the apoptosis rate of ovarian granulosa cells reduced and the clinical pregnancy rate increased in the EZTGD treatment group and the control group ($P < 0.05$, $P < 0.01$). **Conclusion** EZTGD may be through PI3K/Akt signal transduction pathway, down-regulation of Bad factor expression, thereby

基金项目:国家自然科学基金资助项目(No. 81273790);山东省自然科学基金资助项目(No. ZR2016HP29)

作者单位:1. 山东中医药大学附属医院中西医结合生殖与遗传中心(济南 250011);2. 山东中医药大学第一临床学院(济南 250011)

通讯作者:连 方, Tel:13706403122, E-mail: f_lian@163.com

DOI: 10.7661/j.cjim.20171018.393

inhibiting granulosa cells apoptosis, so as to improve the quality of ootid and the outcome of IVF-ET patients with Shen-qi deficiency.

KEYWORDS Erzhi Tiangui Decoction; Shen-qi deficiency; PI3K/Akt signal transduction pathway; *in vitro* fertilization and embryo transfer

现代医学认为卵巢颗粒细胞是卵巢内的主要功能细胞,是卵泡内最主要的体细胞成分,其增殖、分化直接影响卵泡发育、卵子成熟、减数分裂及能量供应^[1-3]。课题组前期研究已证实,二至天癸方能改善肾气虚型体外受精-胚胎移植(*in vitro* fertilization and embryo transfer, IVF)患者的肾气虚症状,提高患者的受精率、优质胚胎率以及临床妊娠率,并能干预蛋白的表达^[4]。在此基础上进行信号转导通路的研究,为深入诠释“肾主生殖”的科学内涵提供了可能性。

资料与方法

1 诊断标准 不孕症的诊断标准:性生活正常,未避孕≥1 年未孕者,称为不孕症^[5]。从未妊娠者称原发性不孕;曾经妊娠而后未再妊娠者称为继发性不孕。不孕症输卵管因素诊断标准参考中国中西医结合学会妇产科专业委员会第三届学术会议一子宫内异位症/妊娠高血压综合征及女性不孕症的中西医诊疗标准^[6]。

不孕证肾气虚辨证标准参《中药新药临床研究指导原则》^[7],主症:不孕;腰膝酸软或足跟痛;经色暗淡或经质稀薄。兼症:头晕耳鸣;小便清长或淋漓不尽;大便溏薄;性欲淡漠;神疲乏力;心悸气短;反应迟钝或健忘。典型舌脉:舌质黯或淡红,苔薄白,两尺脉沉细或沉细弱。同时具备 2 项主症及兼症中的 1~2 项,参照舌脉即可诊断。

2 纳入标准 (1)符合上述诊断标准;(2)近 2 个月经周期未使用激素类药物者;(3)签署知情同意书者;(4)生殖内分泌水平符合降调标准。

3 排除标准 (1)患有严重的精神疾患、泌尿生殖系统急性感染、性传播疾病者;(2)近期接触过射线并在作用期内者;(3)具有吸毒等严重不良嗜好者;(4)子宫不具备妊娠功能或严重的躯体疾病不能承受妊娠者。

4 脱落标准 因各种原因未按规定完成治疗者。

5 一般资料 120 例患者均为 2014 年 3 月—2015 年 1 月就诊于山东中医药大学附属医院中西医结合生殖与遗传中心行 IVF-ET 治疗的肾气虚不孕症患者,按照随机数字表法分为二至天癸方治疗组和安慰剂组,每组 40 例。另选取 40 名因男方因素行 IVF-ET 助孕的女性志愿者作为健康对照组。患者年龄分布,病程,不孕类型,基础 FSH、LH、E₂,差异无统计学意义($P>0.05$,见表 1)。经山东中医药大学附属医院生殖医学伦理委员会同意(No. 20140214M)。

6 干预方法

6.1 IVF-ET 前预处理 3 组患者皆给予常规 IVF-ET 前预处理,二至天癸治疗组患者于 IVF 前 1 个月经周期始自月经第 3 天给予二至天癸方(由菟丝子、女贞子、旱莲草、枸杞子、当归、熟地黄、白芍、川芎、制香附及炙甘草组成。每袋 3 g,每盒 12 袋,由山东中医药大学附属医院制剂室提供),每次 3 袋,每日 2 次,口服,共治疗 14 日,2 个周期。另两组患者给予安慰剂(主要由糊精组成,由山东中医药大学附属医院制剂室提供)一次 3 袋,一日 2 次,治疗天数同上。

6.2 控制性超促排卵方案(controlled ovarian hyperstimulation, COH) 3 组患者均于 IVF 周期前 1 个月经周期的黄体中期(月经的第 21 天左右)根据患者不同情况给予达菲林(GnRH-a,博福-益普生天津制药有限公司;批准文号: H20030577;规格: 3.75 mg/支)0.9~1.2 mg 肌肉注射,自月经周期第 3 天始给予重组人促卵泡激素注射液(rFSH,果纳芬,瑞士雪兰诺公司,批准文号: S2013005575;规格: 75 IU/支)皮下注射和(或)尿促性腺激素(HMG,丽珠集团丽珠制药厂,规格: 75 IU/支)肌注,期间行 B 超以监测卵泡发育,直至发现有直径≥1.8 cm 的卵泡≥3 个以上,予以人绒毛膜促性腺激素(HCG,丽珠集团丽珠制药厂,规格: 5 000 IU/支)8 000~10 000 IU 肌肉注射,36 h 后行取卵术。

表 1 三组患者一般资料比较

组别	例数	原发不孕 [例(%)]	继发不孕 [例(%)]	年龄 (岁, $\bar{x}\pm s$)	不孕年限 (年, $\bar{x}\pm s$)	bFSH (mIU/mL, $\bar{x}\pm s$)	bLH (mIU/mL, $\bar{x}\pm s$)	E ₂ (pg/mL, $\bar{x}\pm s$)
健康对照	40	18(45.0)	22(55.0)	31.57±5.62	3.30±2.59	7.53±2.48	4.47±2.19	44.66±18.79
安慰剂	40	14(35.0)	26(65.0)	33.86±4.82	4.08±2.57	7.20±1.83	4.60±1.47	45.92±17.81
治疗	40	15(37.5)	25(62.5)	32.05±5.21	3.30±2.05	7.51±2.60	4.58±2.35	45.67±22.15

6.3 IVF-ET 取卵的同时收集直径为 18 ~ 20 mm 卵泡的第一管淡黄色、近透明的卵泡液,标记后液氮罐保存。取卵后行 IVF-ET,观察卵细胞、受精及胚胎情况。

7 肾气虚证候积分评价 分别在治疗前和 HCG 注射日记录治疗组及安慰剂组肾气虚证候积分以及差值。

8 收集颗粒细胞 收集卵泡液。离心 (500 r/min, 10 min), 留取沉淀。将沉淀物中加入 PBS 至 5 mL。取 15 mL 离心管, 加入人淋巴细胞分离液 5 mL, 将混悬液缓慢加入淋巴细胞分离液的液面上, 离心 (1 200 r/min, 20 min), 吸取在两液面之间的颗粒细胞层 PBS 离心 (3 000 r/min, 5 min), 下层即为壁颗粒细胞, 吸尽 PBS, -80 °C 直接冻存, 用于 Western blot 实验。

9 卵泡壁颗粒细胞 PI3K、p-Akt、Bad 蛋白表达检测 采用 Western blot 法。将提取的人颗粒细胞加入蛋白裂解液, 冰浴 30 min, 使细胞充分裂解。4 °C, 8 000 r/min 离心 10 min, 收集上清, BCA 法测定蛋白浓度。聚丙烯酰胺凝胶电泳后转膜、封闭, 取出已封闭的 PVDF 膜, 浸于 1xTBST 缓冲液中, 洗涤 5 min。然后加入一抗, 4 °C 孵育过夜。用 1 × TBST 漂洗 3 次孵育后的 PVDF 膜, 移入含有二抗的小袋中, 室温孵育 1 h。用 1xTBST 洗膜 3 次, 15 min/次。ECL 化学发光显影。

10 TUNEL 染色法测细胞凋亡数 随机计数 500 个颗粒细胞, TUNEL 染色阳性细胞的胞浆内呈棕黄色颗粒, 阴性细胞呈蓝色; 结合细胞凋亡的形态学改变综合判断 (阳性细胞出现染色质浓缩, 核膜裂解, 出现凋亡小体; 阴性细胞变小, 胞膜完整但有发泡现象)。颗粒细胞凋亡率 (%) = 阳性细胞数/总的观察细胞数 × 100%。

11 统计学方法 应用 SPSS 19.0 统计软件进行分析, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两两比较采用 *t* 检验, 3 组之间均数比较采用 One-Way ANOVA 方差分析。计数资料采用 χ^2 检验, 组间两两比较采用 Bonferro-ni 调整检验水准法, 检验水准 $\alpha = 0.016$ 。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1 脱落情况 治疗过程中, 由于患者取消周期, 部分病例脱落, 最后治疗组 37 例, 安慰剂组 37 例, 健康对照组 38 例完成治疗。

2 治疗组与安慰剂组肾气虚证候积分比较 (表

2) 与本组治疗前比较, 治疗组 HCG 日证候积分降低 ($P < 0.01$); 与安慰剂组比较, 治疗组前后积分差值更高 ($P < 0.01$)。

表 2 治疗组与安慰剂组肾气虚证候积分比较 (分, $\bar{x} \pm s$)

组别	例数	治疗前	HCG 日	积分差值
治疗	37	13.27 ± 1.84	8.81 ± 1.75 *	4.46 ± 3.42 Δ
安慰剂	37	13.05 ± 1.97	12.68 ± 1.99	0.38 ± 1.36

注: 与本组治疗前比较, * $P < 0.01$; 与安慰剂组比较, $\Delta P < 0.01$

3 3 组患者临床妊娠率比较 健康对照组临床妊娠率为 60.53% (23/38), 安慰剂组为 32.43% (12/37), 治疗组为 62.16% (23/37)。与安慰剂组比较, 健康对照组及治疗组临床妊娠率增高 ($P = 0.015$, 0.010)。

4 3 组 PI3K、p-Akt、Bad 蛋白表达比较 (图 1, 表 3) 与健康对照组比较, 安慰剂组 PI3K、p-Akt 蛋白表达量降低, Bad 蛋白表达量升高 ($P < 0.05$, $P < 0.01$); 与安慰剂组比较, 治疗组 PI3K、p-Akt 蛋白表达量升高, Bad 蛋白表达量降低 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。

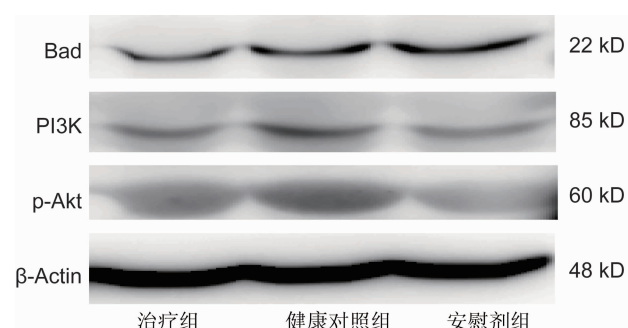


图 1 3 组患者 PI3K、p-Akt、Bad 蛋白电泳图

表 3 3 组患者 PI3K、p-Akt、Bad 蛋白表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	PI3K	p-Akt	Bad
健康对照	38	0.378 7 ± 0.099 7 *	0.340 1 ± 0.070 6 **	0.669 4 ± 0.058 4 **
安慰剂	37	0.326 2 ± 0.058 4	0.266 4 ± 0.075 3	0.754 1 ± 0.049 0
治疗	37	0.384 8 ± 0.061 4 *	0.307 6 ± 0.087 3 **	0.668 8 ± 0.056 6 **

注: 与安慰剂组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

5 3 组患者卵巢颗粒细胞凋亡率比较 (表 4) 健康对照组及治疗组卵巢颗粒细胞凋亡率均明显低于安慰剂组 ($P < 0.01$)。

表 4 3 组患者卵巢颗粒细胞凋亡率比较 (% , $\bar{x} \pm s$)

组别	例数	凋亡率
健康对照	38	12.55 ± 0.60 *
安慰剂	37	20.70 ± 0.56
治疗	37	12.99 ± 0.60 *

注: 与安慰剂组比较, * $P < 0.01$

讨 论

肾藏精,为藏精之脏。肾藏精之充沛与否与卵子生长发育密切相关。肾所藏之精气,是卵子生发之本源,为卵母细胞的生成、生长及成熟提供物质基础。肾精肾气充盛,肾之阴阳平衡,相互转化,卵巢才得以“藏泻有时”,产生优质卵并按时发育成熟排出,为孕育胚胎提供前提条件。肾精化肾气,肾气是机体发挥各种功能活动的原动力,肾气又分阴阳,无论阴虚亦或阳虚,均阻碍卵母细胞的生长、发育、成熟及排出,引起不孕。

卵巢颗粒细胞是卵母细胞周围的细胞层,它与卵母细胞间存在着复杂的连接机制,能够调节卵母细胞的发育。Høst E 等^[8]报道卵巢颗粒细胞的凋亡与卵母细胞的成熟与受精有关。Raman RS 等^[9]研究表明卵母细胞的受精能力与颗粒细胞的凋亡有关, Lee KS 等^[10]研究也表明颗粒细胞的凋亡状态与 IVF-ET 患者的获卵数、受精率以及 IVF 的妊娠结局相关,提示颗粒细胞与 IVF-ET 患者妊娠结局相关,其凋亡状态可以作为预测 IVF-ET 的结局的标志之一。颗粒细胞在卵冠丘复合物的成熟过程中存在着凋亡^[11-15]。颗粒细胞与卵母细胞相连并对其成熟起作用^[8]。IVF-ET 过程中,颗粒细胞凋亡率较低的卵母细胞 ET 后妊娠率更高^[16,17]。因此,颗粒细胞的凋亡与卵母细胞的发育成熟相关^[8,13]。

PI3K/Akt 信号通路是影响细胞凋亡通路最主要的一条,其机制为 PI3K 扩增及 Akt 的过度活化^[18]。目前,以 PI3K/Akt 信号通路关键效应分子及靶基因 p-Akt、PI3K、Bad 为靶点的凋亡抑制正在成为研究的热点^[19]。卵巢中颗粒细胞的凋亡与普通细胞存在相似之处,但也有自己独特的调控模式。已知与颗粒细胞凋亡相关的因素包括基因、细胞因子等^[20]。其中基因的参与尤为重要。Bcl-2 家族在颗粒细胞凋亡的调控中起着决定性作用^[21]。研究显示,Bcl-2 能够抑制颗粒细胞凋亡,而 Bad 蛋白能够拮抗 Bcl-2 的生物学活性^[22]。

本研究结果显示:二至天癸方治疗组治疗后肾气虚症状较治疗前明显改善,证候积分降低($P < 0.01$);二至天癸方治疗组获卵数、获胚数较安慰剂组均较高($P < 0.01$),二至天癸治疗组的临床妊娠率(62.16%)高于安慰剂组(32.43%, $P < 0.05$);与安慰剂组比较,治疗组 PI3K、p-Akt 蛋白表达量升高,Bad 蛋白表达量降低($P < 0.05$, $P < 0.01$);治疗组卵巢颗粒细胞凋亡率较安慰剂组低($P < 0.01$)。表明二至天癸方可明显改善肾气虚 IVF 女性肾虚状态,

提高其临床妊娠率,其可能是通过 PI3K/Akt 通路下调 Bad 水平表达,抑制颗粒细胞的凋亡,从而改善肾气虚型不孕症患者卵细胞质量,提高其 IVF-ET 成功率。

二至天癸方以“补肾调冲任”的立法之本,能够提高 IVF-ET 患者卵子质量,改善子宫内膜容受性,从而提高不孕症患者的妊娠率。菟丝子补益肾精,既可补阳,又可益阴,女贞子、枸杞子、旱莲草滋补肝肾,熟地黄养阴补血、滋养精髓,川芎活血调经,当归补血调经,白芍养血敛阴,香附疏肝解郁,全方共奏补益肝肾,调理冲任之功,使肾中阴平阳秘,精血俱旺,肾精充盛,血海按期满盈,则胎孕可成。PI3K/Akt 信号通路的配体还包括 Foxo3a、P₂₁、P₂₇ 等^[23],二至天癸方是否能通过增加 Akt 的表达而调控其他因子如 Foxo3a 等的信号转录,还有待于进一步研究。

参 考 文 献

- [1] Hughes FM Jr, Gorospe WC. Biochemical identification of apoptosis (programmed cell death) in granulosa cells: evidence for a potential mechanism underlying follicular atresia[J]. *Endocrinology*, 1991, 129(5): 2415-2422.
- [2] Nakahara K, Saito H, Saito T, et al. The incidence of apoptotic bodies in membrana granulosa can predict prognosis of ova from patients participating in *in vitro* fertilization programs[J]. *Fertil Steril*, 1997, 68(2): 312-317.
- [3] Høst E, Mikkelsen AL, Lindenberg S, et al. Apoptosis in human cumulus cells in relation to maturation stage and cleavage of the corresponding oocyte[J]. *Acta Obstet Gynecol Scand*, 2000, 79(11): 936-940.
- [4] 连方, 王岩, 孙振高, 等. 基于蛋白质组学对肾气虚证患者卵泡液的研究及中药的干预作用[J]. *中华中医药杂志*, 2014, 29(7): 2161-2164.
- [5] 丰有吉, 沈铿主编. 妇产科学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2001: 394.
- [6] 中国中西医结合学会妇产科专业委员会第三届学术会议. 子宫内膜异位症、妊娠高血压综合征及女性不孕症的中西医结合诊疗标准[J]. *中国中西医结合杂志*, 1991, 11(6): 376-379.
- [7] 郑筱萸主编. 中药新药临床研究指导原则[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2002: 385-390.
- [8] Høst E, Gabrielsen A, Lindenberg S, et al. Apoptosis in human cumulus cells in relation to zona pellucida thickness variation, maturation stage, and cleavage of the corresponding oocyte after

- intracytoplasmic sperm injection[J]. Fertil Steril, 2002, 77(3): 511–515.
- [9] Raman RS, Chan PJ, Corselli JU, et al. Comet assay of cumulus cell DNA status and the relationship to oocyte fertilization via intracytoplasmic sperm injection[J]. Hum Reprod, 2001, 16(5): 831–835.
- [10] Lee KS, Joo BS, Na YJ, et al. Cumulus cells apoptosis as an indicator to predict the quality of oocytes and the outcome of IVF–ET[J]. J Assist Reprod Genet, 2001, 18(9): 490–498.
- [11] Torner H, Brtissow KP, Alm H, et al. Mitochondrial aggregation patterns and activity in porcine oocytes and apoptosis in surrounding cumulus cells depends on the stage of pre-ovulatory maturation[J]. Theriogenology, 2004, 61(9): 1675–1689.
- [12] Zeuner A, Müller K, Reguszynski K, et al. Apoptosis within bovine follicular cells and its effect on oocyte development during *in vitro* maturation[J]. Theriogenology, 2003, 59(5–6): 1421–1433.
- [13] Nakahara K, Saito H, Saito T, et al. Incidence of apoptotic bodies in membrane granulosa of the patients participating in an *in vitro* fertilization program[J]. Fertil Steril, 1997, 67(2): 302–308.
- [14] Torner H, Heleil B, Alm H, et al. Changes in cumulus-oocyte complexes of pregnant and non-pregnant camels (*Camelus dromedarius*) during maturation *in vitro* [J]. Theriogenology, 2003, 60(5): 977–987.
- [15] Smith SD, Mikkelsen AL, Lindenberg S. Development of human oocytes matured *in vitro* for 28 or 36 hours[J]. Fertil Steril, 2000, 73(3): 541–544.
- [16] Dell Aquila ME, Albrizio M, Maritato F, et al. Meiotic competence of equine oocytes and pronucleus formation after intracytoplasmic sperm injection (ICSI) as related to granulosa cell apoptosis[J]. Biol Reprod, 2003, 68(6): 2065–2072.
- [17] Benifla JL, Sifer C, Bringuier AF, et al. Induced apoptosis and expression of related proteins in granulosa cells from women undergoing IVF: a preliminary study [J]. Hum Reprod, 2002, 17(4): 916–920.
- [18] Samuels Y, Wang Z, Bardelli A, et al. High frequency of mutations of the PIK3CA gene in human cancers [J]. Science, 2004, 304(5670): 554.
- [19] Piotr G, Rychahou MD, Lindsey N, et al. Targeted molecular therapy of the PI3K pathway: therapeutic significance of PI3K subunit targeting in colorectal carcinoma[J]. Ann Surg, 2006, 243(6): 833–844.
- [20] 姜泊主编. 细胞凋亡基础与临床[M]. 北京: 人民军医出版社, 1999: 248–250.
- [21] Sasson R, Tajima K, Amsterdam A. Glucocorticoids protect against apoptosis induced by serum deprivation, cyclic adenosine 3' 5'-monophosphate and p53 activation in immortalized human granulosa cells: involvement of Bcl-2[J]. Endocrinology, 2001, 142(2): 802–811.
- [22] Krajewski S, Krajewska M, Shabaik A, et al. Immunohistochemical determination of *in vivo* distribution of Bax, a dominant inhibitor of Bcl-2[J]. Am J Pathol, 1994, 145(6): 1323–1336.
- [23] Bugering BM, Kops GJ. Cell cycle and death control: long live Forkheads [J]. Trends Biochem Sci, 2002, 27(7): 352–360.

(收稿: 2016–05–12 修回: 2017–10–20)

责任编辑: 汤 静