

多因素对昆明小鼠胚胎干细胞原代集落形成和后期增殖的影响 *

陈 博^{1,2} 赵云程¹ 陈士斌^{1,2} 王 静^{1,2} 金贤华^{1,2} 黄俊成^{1,Δ}

(1 新疆畜牧科学院农业部草食家畜繁育生物技术重点开放实验室 新疆 乌鲁木齐 830000;

2 新疆农业大学 新疆 乌鲁木齐 830052)

摘要 目的:研究细胞因子 LIF、EGF、bFGF 和肝素钠,以及氧分压、温度等多因素对昆明系小鼠胚胎干细胞(KM-ESC)原代集落形成和后期增殖的影响。**方法:**本研究选择 LIF、EGF、bFGF、肝素钠、5% O₂、20% O₂ 和 37℃、39℃作为研究条件。并检测不同情况下小鼠胚胎干细胞原代集落形成和后期增殖情况。**结果:**LIF 对 KM-ESC 原代集落形成和后期增殖具有显著促进作用,极显著高于 EGF、bFGF 和肝素钠组(P<0.01)。温度对 KM-ESC 原代集落形成和增殖具有显著影响,39℃条件下,原代集落形成率、直径和后期增殖显著高于 37℃(P<0.05);而氧分压对 KM-ESC 原代集落形成无显著作用(P>0.05),但是对原代集落直径和后期增殖有一定促进作用,20% O₂ 组显著高于 5% O₂ 组(P<0.05)。**结论:**LIF、EGF、bFGF、肝素钠、39℃、20% O₂ 对小鼠胚胎干细胞原代集落形成和后期增殖具有显著促进作用。

关键词:胚胎干细胞,细胞因子,温度,氧分压

中图分类号:Q813.11 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2011)04-611-04

Effects of Several Factors on Colony Formation and Post Growth of Generation of Primary Kunming Mouse ESC*

CHEN Bo^{1,2}, ZHAO Yun-cheng², CHEN Shi-bin^{1,2}, WANG Jing^{1,2}, JIN Xian-hua^{1,2}, HUANG Jun-cheng^{1,Δ}

(1 Key Laboratory of Animal & Veterinary Biotechnology of MOA, Xinjiang Academy of Animal Science, Urumqi 830000, China;

2 Xinjiang Agricultural University, Urumqi 830052, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the effects of several factors such as cytokines (LIF, EGF, bFGF), heparin sodium, Oxygen Stressand, temperature on colony formation and post growth of primary Kunming mouse embryonic stem cell (KM-ESC). **Method:** LIF, EGF, bFGF, 5% O₂, heparin sodium, 20% O₂ Oxygen Stressand and 37℃, 39℃ were used in this study. Colony formation and post growth of primary Kunming mouse embryonic stem cell (KM-ESC) in LIF, EGF, bFGF, heparin sodium, Oxygen Stressand, temperature were detected. **Result:** LIF has a significant promoting function on colony formation and post growth of primary KM-ESC, on which the temperature has a significant effect, higher than on EGF, bFGF and the group of heparin sodium. (P<0.01) Under the condition of 39℃, the colony formation rate, diameter and post growth are higher than 37℃ (P<0.05). Oxygen Stress has no effect on colony formation of KM-ESC (P>0.05), but has a promote effect on colony diameter and post growth. The group of 20% O₂ is a little higher than the group of 5% O₂ (P<0.05). **Conclusion:** LIF, EGF, bFGF, 5% O₂, heparin sodium, 20% O₂ Oxygen Stressand and 39℃ had promoting function on colony formation and post growth of primary KM-ESC.

Key words: ESC; Cytokine; Temperature; Oxygen Partial Pressure

Chinese Library Classification: Q813.11 **Document code:** A

Article ID:1673-6273(2011)04-611-04

前言

胚胎干细胞(embryonic stem cell, ESC)是由囊胚内细胞团(inner cell mass, ICM)分离培养而来,具有分化能力和无限增殖能力^[1,2]。由于其独特的生物学特性,在体外研究胚胎发育、组织移植、细胞治疗和基因治疗的细胞源、克隆动物、转基因动物生产、疾病模型、组织器官修复等方面有着诱人的前景。目前,仅有小鼠^[3,4]、人^[5]、大鼠^[6]等 ESC 建系成功,并且小鼠胚胎干细胞(mESC)建系研究表明,mESC 建系工作严格受到小鼠品

系的制约,即便适宜 mESC 建系的 129 品系小鼠,其建系率仅为 76.5%^[7]。目前我国 mESC 研究工作,主要依赖于国外已经建系的 mESC,但这些 mESC 往往表现出:代数较高,核型异常发生率高等特点,严重制约我国 mESC 的研究与应用,因此迫切需要建立我国自主知识产权的"低代数"mESC。

目前我国常规实验动物中,昆明小鼠(KM 鼠)是我国生产量、使用量最大的小鼠品种,1944 年由印度 Hoffkine 研究所引进,与瑞士种小鼠(Swiss mice)属同一起源^[8]。KM 鼠以其基因库大,基因杂合率高、繁殖率高、适应力强等优良性状,广泛应用

* 基金项目:国家"十一·五"863 计划项目(2008aa101005),新疆维吾尔自治区高技术研究发展计划项目(200711104)、新疆畜牧科学院青年科研基金项目(2008QJ01,2010QJ006)资助,中国博士后科学基金项目(200801450)

作者简介:陈博(1984),男,硕士研究生,研究方向:动物胚胎工程学。TEL:15199456824, E-mail:64876837@qq.com

Δ 通讯作者:黄俊成(1968-),男,研究员,博士,研究方向:胚胎工程。TEL:13999912246, E-mail:h_jc @163.com

(收稿日期:2010-11-16 接受日期:2010-12-11)

于我国药理学、毒理学、生物制品的生产、检定等领域。虽然昆明鼠胚胎干细胞(KM-ESC)研究工作已开展多年,但 KM-ESC 分离效率低,集落不稳定、易分化,建系效率仅为 5-12%^[9]。目前,国外对 mESC 研究较多,培养体系也基本完善,但是这些培养体系并不一定适用于国内 KM-ESC,因为品系是影响 ESC 建系的一个重要因素^[10],并且 KM-ESC 建系仍然面临着巨大困难^[11-14]。因此,研究 KM-ESC 的培养条件十分必要。同时,也有人提出培养温度和气相环境对 ESC 的形成和增殖有一定影响^[15,16]。所以本实验根据已经报道的研究结果,采用 N2B27 无血清培养体系,对比两种氧分压 5% O₂、20% O₂ 和温度 37℃、39℃;以及分别添加白血病抑制因子(LIF)、表皮细胞生长因子(EGF)、碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)和肝素钠等细胞生长因子和药物,筛选出能够明显提高 KM-ESC 原代集落形成率和增殖的生长因子或药物以及最适宜的培养条件。从而为 KM-ESC 进一步研究提供参考。

1 材料和方法

1.1 实验动物

昆明系小白鼠购买于新疆实验动物研究中心,4-8 周龄,体重 20-30g,试验动物生产许可证号 SCXK(新)2003-002,使用许可证号:SY(新)2003-003。

1.2 试剂

DMEM/F-12 (Invitrogen, 11320033), Tyrode's Solution(Sigma, T1788-100ML), mLIF (Sigma, L5158-5UG), N-2 Supplement (Invitrogen, 17502048), B-27 Supplement (Invitrogen, 17504044), SU5402 (Calbiochem, 572630), CHIR99021 (Stemole, 04-0004), PD0325901 (Stemolecule, 04-0006), Tryple Express (Invitrogen, 12605010), MEN NEAA (Sigma, G8540-100G), L-Glutamine (Sigma, G8540-100G), β-Mercaptoethanol(Amresco, 0482-100ml), 肝素钠(上海山浦化工有限公司), EGF (Sigma, E4127-1MG), bFGF(Sigma, B6766-25UG)。

1.3 小鼠超数排卵与胚胎收集

选择发情间期或初期的昆明白雌鼠,注射 PMSG 5 IU/只, 46-48 小时注射 hCG 5 IU/只,并与雄性昆明白鼠合笼,见栓即

为第 0 天,第 3.5 天将供体小鼠人性化处死,取出子宫,用含 0.5%PVP 的 DPBS 液冲出胚胎。

1.4 在不同细胞因子和药物中对培养 KM-ESC 原代集落形成

将收集到的囊胚用细口毛细管在基础液(3i)中反复吹打 2-3 遍,去掉透明带。将去除透明带的昆明白小鼠裸胚分别移入平衡好的培养微滴中,每滴接种 1 枚裸胚放置培养箱中,第 4 日统计原代集落形成率,并测量集落直径。

基础液(3i): DMEM/F12+10μl/ml N-2 Supplement+20μl/ml B-27 Supplement+1μl/ml β-Mercaptoethanol+10μl/ml MEN NEAA+10μl/ml L-Glutamine+1uM PD0325901+3uM CHIR99021+2μl M SU5402。

1.5 在不同细胞因子和药物中测定 KM-ESC 增殖

从 3i、3i+LIF、3i+bFGF、3i+EGF 和 3i+ 肝素钠组中选取形态良好的集落在 Tryple Express 中消化传代,然后接种直径 50-100μm 左右的 KM-ESC 小集落放入相对应的细胞因子培养基中,每滴液(30ul)中接种 1 枚 KM-ESC 集落,每 24h 测量集落的直径,48h 半量换液,培养 4 天,分析处理数据并绘制生长曲线。

1.6 温度和氧分压对 KM-ESC 原代集落形成和后期增殖的影响

将脱掉透明带的昆明小鼠囊胚移入平衡好的 3i+LIF 培养液中,然后分别放入 5% O₂、37℃;5% O₂、39℃;20% O₂、37℃和 20% O₂、39℃的培养环境中,培养 4d 观察原代集落形成和测量集落大小。原代集落经 Tryple Express 消化传代后,选取生长良好、直径在 50-100μm 左右的 KM-ESC 小集落接种在平衡好的培养微滴中(30ul),每滴液中接种 1 枚 KM-ESC 集落。在 4 种不同的培养环境中培养,每 24h 测量一次集落的直径。48h 半量换液,培养 4 天,分析处理数据并绘制生长曲线。

1.7 统计学分析

各分组所得计量数据采用 SPSS10.0 软件处理数据,实验组组间均数比较用 t 检验。

2 结果

2.1 细胞因子和药物对 KM-ESC 原代集落形成率的影响

表 1 细胞因子和肝素钠对 KM-ESC 原代集落形成的影响

Fig 1 Effects of cytokines and heparin sodium on the generation of primary KM-ESC

Experimental Group	Primary colony Formation Ratio	Colony Diameter
3i	73.4%(22/30) ^a	114.7± 19.5 ^a
3i+LIF	86.7%(26/30) ^b	129.4± 15.9 ^b
3i+bFGF	76.7%(23/30) ^a	109.6± 16.0 ^a
3i+EGF	80%(24/30) ^a	111.9± 17.8 ^a
3i+ sodium heparin	76.7%(23/30) ^a	114.6± 9.7 ^a

Note: Primary colony Formation Ratio and Colony Diameter, b p<0.01: 3i+LIF group compared with 3i ,3i+bFGF ,3i+EGF ,3i+sodium heparin group;

LIF 对 KM-ESC 原代集落形成和集落直径明显高于 bFGF、EGF、肝素钠和对照组(p<0.01),而 bFGF、EGF 和肝素钠对 KM-ES 原代集落形成和集落直径与对照组无显著差异

(P>0.05),且组间也无差异(P>0.05)。(表 1)。

2.2 不同细胞因子和药物对 KM-ESC 后期增殖的影响

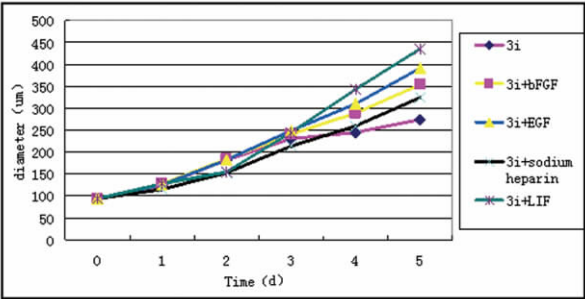


图 1 细胞因子和肝素钠对 KM-ESC 后期增殖的影响

Fig.1 Effects of cytokines and heparin sodium on the growth curve
KM-ESC

表 2 温度和氧分压对 KM-ESC 形成的影响

Table 2 Effect of temperature and oxygen partial ressure on the generation of primary KM-ESC

Experimental Group	Primary colony Formation Ratio	Colony Diameter
5%O ₂ 、37℃	70%(21/30) ^a	78.8± 16.9 ^a
5%O ₂ 、39℃	86.7%(26/30) ^b	103.8± 8.8 ^b
20%O ₂ 、37℃	76.7%(23/30) ^a	86.7± 7.0 ^c
20%O ₂ 、39℃	90%(27/30) ^b	114.7± 19.5 ^d

Note: Primary colony Formation Ratio: a p<0.01: 5%O₂、37℃ group compared with 5%O₂、39℃ group; 20%O₂、37℃ group compared with 20%O₂、39℃group; Colony Diameter: a b c d p<0.01: Each other compared among group

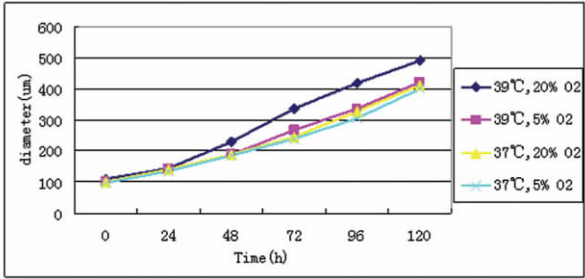


图 2 温度和氧分压对 KM-ESC 增殖的影响

Fig. 2 Effect of temperature and oxygen partial pressure on the growth curve of KM-ESC

在 5% O₂、37℃; 5% O₂、39℃; 20% O₂、37℃和 20% O₂、39℃ 各组中, 20% O₂、39℃组对 KM-ESC 后期增殖极显著高于其他实验组(p<0.01), 而其余组组间无差异(P>0.05) (图 2)。但是, 在相同气压下(5%或 20% O₂), 37℃组 KM-ESC 原代集落形成率、直径和后期增殖极显著低于 39℃组(p<0.01) (表 2, 图 2); 在相同温度下(37℃或 39℃), 20% O₂ 对 KM-ESC 原代集落形成率高于 5% O₂, 但无差异(P>0.05), 然而, 20% O₂ 对 KM-ESC 集落直径和后期增殖显著高于 5% O₂(p<0.05) (表 2, 图 2)。

3 讨论

一般传统的 ESC 培养采用体细胞培养的温度(37℃)和气象(5% O₂), 我们通过对比 5% O₂、37℃; 5% O₂、39℃; 20% O₂、37℃和 20% O₂、39℃各组, 得知 39℃, 20% O₂ 的培养条件是 KM-ESC 原代形成和后期增殖的最佳环境。并且研究结果显示 39℃更适用于获得较大直径的 KM-ESC 原代集落, 同时对增殖有显著促进作用; 而增大氧分压有助于提高 KM-ESC 原始

LIF、EGF、bFGF 和肝素钠对 KM-ESC 增殖有明显的促进作用 (图 1)。在 KM-ESC 增殖过程中, 肝素钠一直低于 LIF、EGF、bFGF(p<0.01), 在培养第 4 天后肝素钠高于对照组(p<0.01); 在培养 3 天后, LIF、EGF 和 bFGF 对 KM-ESC 增殖与对照组存在极显著差异 (p<0.01), 且 LIF 极显著高于其他实验组 (p<0.01), 而 LIF、EGF、bFGF、肝素钠和对照组组内差异呈极显著(p<0.01)。

2.3 温度和氧分压对 KM-ESC 原代集落形成和后期增殖的影响

集落直径和后期增殖, 但没有显著作用, 同时对 KM-ESC 原代集落形成也没有显著作用; 从而说明了, 氧分压不是影响 KM-ESC 原代集落形成和后期增殖的主要因素, 而温度是 KM-ESC 建系和后期增殖的主要影响因素之一。该结果与 Wang^[15]等报道生理条件的氧分压和糖浓度促进 mESC 增殖的结果一致。据推测在体外培养中, 胚胎的培养温度和气象接近 39℃, 20% O₂, 本实验 20% O₂、39℃组对 KM-ESC 原代集落形成和后期增殖的促进作用可能是由于 KM-ESC 来源于胚胎发育后期的囊胚内细胞团, 所以在 KM-ESC 原代培养和后期增殖的生长环境条件下应该更类似于胚胎培养的生长环境。

至今除了小鼠 ESC 建系^[3,4], 也仅有人^[5]和大鼠^[6]的 ESC 建系成功。其它大多数物种的 ESC 建系研究也参照 mESC 和 hESC 的成功经验, 将饲养层细胞、条件培养基、细胞因子、生长因子、激素、胎牛血清和血清提取物等进行有机组合, 试图寻找适合的培养条件组合。而本实验采用 N2B27 无血清无饲养层培养基, 该体系中的各种成份比较明确, 有利于对 mESC 研究。本实验研究表明, LIF、bFGF、EGF 和肝素钠对 KM-ESC 后期增殖有促进作用, 组间差异显著(p<0.01); 同时 LIF 对 KM-ESC 原代集落形成、集落直径和后期增殖的促进作用显著高于其他组(p<0.05), 而 bFGF、EGF 和肝素钠对 KM-ESC 原代集落形成无显著作用(P>0.05)。Aitstin G^[16]研究发现 LIF 能通过抑制程序性细胞死亡而使 ICM 和 ESC 细胞数增加, 这也间接的验证了本实验中 LIF 对 KM-ESC 原代集落形成和增殖的促进作用显著高于其他组。随着 mESC 分子调控机制的逐步揭示, LIF-STAT3 途径是维持 mESC 多潜能性, 自我更新的重要途径^[17,18]。据推测, 虽然品系是影响 ESC 建系的一个重要因素^[10], 但是 LIF 对 KM-ESC 的影响同其它 mESC 一样具有重要的作用。另

外,大鼠胚胎干细胞(rESC)研究表明,外源 hLIF 能有效促进 rESC 集落形成率,因此 Buehr 推测,LIF-STAT3 应该是 " 真正 " 意义上的 ESC 本质特性^[6]。而 EGF 是一种广谱促有丝分裂因子促进 DNA 的合成和 RNA 的转录并使 S 期提前细胞周期缩短对 ES 细胞的增殖有促进作用^[19,20],Heo Jung Sun^[21]等报道 EGF 能够促进 hESC 增殖,阻断 EGF 受体可以抑制 hESC 的增殖,与本实验结果一致。bFGF 在 hESC 中是自我更新机制中的核心调控因子^[22,23],对 hESC 多能性维持的起到十分重要的调控作用^[24-26]。不过我们研究发现 bFGF 也能促进 mESC 增殖,但增殖效果明显低于 LIF,与黄锦桃^[27]结果一致。Miho^[28]等证明在无血清和饲养层的条件下肝素钠能够促进 hESC 的增殖,维持 hESC 的未分化状态。而我们的结果显示,肝素钠对 mESC 的增殖效果没有显著作用,据推测可能肝素钠对 mESC 与 hESC 的增殖具有种属特异性。

参考文献(References)

- [1] Brook FA, Gardner RL. The origin and efficient derivation of embryonic stem cells in the mouse [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 94, 5709-5712
- [2] Keller G. Embryonic stem cell differentiation: emergence of a new era in biology and medicine [J]. Genes Dev, 2005, 19: 1129-1155
- [3] Evans MJ, Kaufman M. Establishment in culture of pluripotent cells from mouse embryos [J]. Nature, 1981, 292: 154-156
- [4] Martin GR. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells [J]. Proc. Natl Acad Sci, 1981, 78: 7634-7638
- [5] Thomson JA, Itskovitz EJ, Shapiro SS et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts [J]. Science, 1998, 282 (5391): 1145-1147
- [6] Meek S, Blair K, Yang J, et al. Capture of authentic embryonic stem cells from rat blastocysts[J]. Cell, 2008, 135(7): 1287-1298
- [7] Battle ML, Smith A, Nichols J. Parameters influencing derivation of embryonic stem cells from murine embryos[J]. Genesis, 2008, 46(12): 758-767
- [8] 章根木, 姚甘火. 中国昆明小鼠(KM 鼠)遗传背景资料调查[J]. 中国实验动物学杂志, 1997, 7(4): 246-251
Zhang Gen-mu, Yao Gan-huo. The survey of hereditary background information on Kunming mouse of China (KM mouse) [J]. Chinese experimental magazine on animals, 1997, 7(4): 246-251
- [9] 鲍君红, 刘慧雯, 王锦绣. 昆明小鼠胚胎干细胞囊胚孵出前不同培养方法的效果比较 [J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2007, 11 (15): 2817-2821
Bao Jun-hong, Liu Hui-hong, Wang Jin-xiu. The comparison of results on different cultural methods before embryos y hatching of embryonic stem cells on Kunming mouse [J]. The study of organizational engineering and clinical rehabilitation in China, 2007, 11(15):2817-2821
- [10] Suzuki O, Matsuda J, Takano K, et al. Effect of genetic background on establishment of mouse embryonic stem cells[J]. 1999, Exp Anim, 48(3): 213-6
- [11] 李相运, 邸科前, 魏巍. 品系对小鼠胚胎干细胞分离效率的影响[J]. 动物学研究, 2005, 26(3): 250-254
Li Xiang-yun, Di Ke-qian, Wei Wei. The strain has influence on isolation ratio of mouse embryonic stem cells[J]. Animal study, 2005, 26 (3): 250-254
- [12] 秦茂林, 蔡文琴, 姚忠祥. 昆明种系小鼠胚胎干细胞的分离培养及特性鉴定[J]. 第三军医大学学报, 2001, 23(9): 1071-1073
- [13] 李煜, 梁琳, 王振飞等. 昆明白小鼠胚胎干细胞分离与体外培养[J]. 细胞生物学杂志, 2007, 29: 885-888
Li Yu, Liang Lin, Wang Zhen-fei and so on, the insolation and culture in-vitro on Kunming mouse embryonic stem cells [J]. Cytobiology magazine, 2007, 29: 885-888
- [14] 戴开丽, 仇恒滨, 严为巧. 昆明小鼠胚胎干细胞建系的初步研究[J]. 广西农业生物科技, 2008, 27(4): 329-334
Qiang Kai-li, Qiu Heng-bin, Yan Wei-qiao. The initiatory study of Kunming mouse embryonic stem cells lines [J]. Guangxi agricultural biological technology, 2008, 27(4): 329-334
- [15] Wang F, Thirumangalathu S, Locken MR, et al. Establishment of new mouse embryonic stem cell lines is improved by physiological glucose and oxygen [J]. Cloning Stem Cells, 2006 8(2): 108-16
- [16] Aitstin G, Smith F. Differentiation inhibiting activity (DLA/ LIF) and mouse development [J]. Dev Biol, 1992, 151: 339-351
- [17] Smith AG, Heath JK, Donaldson DD, et al. Inhibition of pluripotent embryonic stem cell differentiation by purified polypeptides [J]. Nature, 1988, 336(6200): 688-690
- [18] Williams RL, Hilton DJ, Pease S, et al. Myeloid leukemia inhibitory factor maintains the developmental potential of embryonic stem cells [J]. Nature, 1988, 336(6200): 684-687
- [19] 李文泽. 表皮生长因子研究进展[J]. 生命的化学, 1992, 12(1): 5-9
Li Wen-ze. The study and advancement on epidermis growth factor [J]. Biotic chemistry, 1992, 12(1): 5-9
- [20] Health JK. Mammalian Primordial Germ Cells Development in mammals[J]. New York North Holland Press, 1979, 3: 268-298
- [21] Heo JS, Lee YJ, Han HJ. EGF stimulates proliferation of mouse embryonic stem cells: involvement of Ca^{2+} influx and p44/42 MAPKs[J]. Am J Physiol Cell Physiol, 2006, 290: 123-133
- [22] Amit M, Carpenter MK, Inokuma MS, et al. Clonally derived human embryonic stem cell lines maintain pluripotency and proliferative potential for prolonged periods of culture [J]. Dev Biol, 2000, 227(2): 271-278
- [23] Xu C, Inokuma MS, Denham J, et al. Feeder-free growth of undifferentiated human embryonic stem cells [J]. Nat Biotechnol, 2001, 19 (10): 971-974
- [24] Dvorak P, Hampl A. Basic fibroblast growth factor and its receptors in human embryonic stem cells [J]. Folia Histochem Cytobiol, 2005, 43(4): 203-208
- [25] Kang HB, Kim JS, Kwon HJ, et al. Basic fibroblast growth factor activates ERK and induces c-fos in human embryonic stem cell line Mizhes[J]. Stem Cells Dev, 2005, 14(4): 395-401
- [26] Levenstein ME, Ludwig TE, Xu RH, et al. Basic fibroblast growth factor support of human embryonic stem cell self-renewal [J]. Stem Cells, 2006, 24(3): 568-574
- [27] 黄锦桃, 程树军, 刘爱军, 等. bFGF 对小鼠 ES 细胞生长增殖的影响[J]. 中山大学学报, 2005, 26(3): 1-2
Huang Jin-tao, Cheng Shu-jun, Liu Ai-jun, et al. The influence of bFGF on growth and increment of mouse embryonic stem cells[J]. Zhong Shan university journal, 2005, 26(3): 1-2
- [28] Miho K, Furue JN, Jamie P, et al. Heparin promotes the growth of human embryonic stem cells in a defined serum-free medium[J]. Cell Biology, 2008, 105(36): 13409-13414