

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2020.06.008

· 基础研究 ·

lncRNA CCAT2对宫颈癌CaSki细胞增殖及周期的影响

王霞, 姚玉君, 汤静, 李开慧(鄂州市中医医院 妇产科, 湖北 鄂州 436000)

[摘要] **目的:** 研究长链非编码RNA(long non-coding RNA, lncRNA)CCAT2对宫颈癌细胞增殖、周期的影响。**方法:** 采用qPCR法检测3种宫颈癌细胞(HeLa、C-33A和CaSki)中CCAT2的表达水平,选择表达水平最高的细胞进行后续实验。设计合成CCAT2过表达及干扰载体,转染细胞后,qPCR检测转染效率。细胞分为5组:对照组、干扰空载(sh-EV)组、过表达空载(overExp-EV)组、CCAT2干扰(sh-CCAT2)组和CCAT2过表达(overExp-CCAT2)组,MTT法检测各组细胞增殖活力,流式细胞术检测细胞周期,WB法检测细胞中Ki67、细胞周期蛋白D1(Cyclin D1)和周期蛋白依赖性激酶4(cyclin-dependent kinase 4, CDK4)表达水平。**结果:** 在HeLa、C-33A和CaSki 3种细胞系中,选择CCAT2表达水平最高的CaSki细胞为研究对象。CCAT2过表达及干扰载体均成功转入细胞,转染效果明显。与对照组比较,sh-CCAT2组细胞增殖活力显著降低($P<0.01$)、G1期细胞比例显著升高($P<0.01$),Ki67、Cyclin D1及CDK4表达水平显著降低(均 $P<0.01$);而overExp-CCAT2组与之相反,细胞增殖能力增强,且Ki67、Cyclin D1及CDK4表达水平显著升高(均 $P<0.01$)。**结论:** CCAT2通过调控细胞增殖及周期相关蛋白的表达,进而影响宫颈癌CaSki细胞的增殖和周期。

[关键词] 长链非编码RNA;CCAT2;宫颈癌;CaSki细胞;细胞增殖;细胞周期

[中图分类号] R730.51;R730.54;R737.3 [文献标识码] A [文章编号] 1007-385X(2020)06-0640-06

Effect of lncRNA CCAT2 on proliferation and cell cycle of cervical cancer CaSki cells

WANG Xia, YAO Yujun, TANG Jing, LI Kaihui (Department of Gynaecology and Obstetrics, Ezhou Hospital of Traditional Chinese Medicine, Ezhou 436000, Hubei, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect of long non-coding RNA (lncRNA)-CCAT2 on the proliferation and cell cycle of cervical cancer cells. **Methods:** The expression of CCAT2 in 3 cervical cancer cell lines (HeLa, C-33A, and CaSki) was detected by qPCR and the cell line with the highest expression level was selected for subsequent experiments. CCAT2 overexpression and interference vectors were designed and synthesized. After transfection, qPCR was performed to detect the transfection efficiency. The cells were divided into 5 groups: control, sh-EV (empty vector), overExp-EV, sh-CCAT2, and overExp-CCAT2. MTT assay was performed to evaluate cell viability. Flow cytometry was performed to measure cell cycle. WB was performed to detect the expressions of Ki67, cyclin D1, and cyclin dependent kinase 4 (CDK4). **Results:** Among HeLa, C-33A, and CaSki cells, the highest expression of CCAT2 was found in CaSki cells. CCAT2 overexpression and interference vectors were successfully transfected into the CaSki cells. Compared with the control group, the cells viability and proliferation in the sh-CCAT2 group was significantly decreased (all $P<0.01$), the proportion of cells in the G1 phase was significantly increased ($P<0.01$), and the expression levels of Ki67, cyclin D1, and CDK4 were significantly decreased (all $P<0.01$). However, in the overExp-CCAT2 group, the cell proliferation was enhanced and the expression levels of Ki67, cyclin D1, and CDK4 were significantly increased (all $P<0.01$). **Conclusion:** CCAT2 affects proliferation and cell cycle of cervical cancer cells by regulating the expressions of their associated proteins.

[Key words] long non-coding RNA (lncRNA); CCAT2; cervical cancer; CaSki cell; cell proliferation; cell cycle

[Chin J Cancer Biother, 2020, 27(6): 640-645. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2020.06.008]

根据国际癌症研究机构(International Agency for Research on Cancer, IARC)对全球2018年癌症发病率和病死率的估算,发现宫颈癌的发病率和病死率均排在女性癌症的前四位,是威胁全球女性生命的主要疾病之一^[1];受到筛查和治疗技术的限制,发展中国家宫颈癌的发病率和病死率远高于发达国家^[2-3]。宫颈癌的主要治疗方法包括手术、放化疗等,

[基金项目] 湖北省卫生健康委员会2019年面上资助项目(No. WJ2019M073)。Project supported by the General Program of Hubei Provincial Health Commission in 2019 (No. WJ2019M073)

[作者简介] 王霞(1977-),女,学士,副主任医师,主要从事妇科肿瘤的临床与基础研究,E-mail:1848424002@qq.com

[通信作者] 李开慧(LI Kaihui, corresponding author),副主任医师,主要从事妇科肿瘤的临床与基础研究,E-mail:1500629087@qq.com

但疗效甚微, 仍有85%以上的宫颈癌病死率发生在发展中国家^[4]。因此, 对宫颈癌有效治疗方案的研发是迫切需要的。

长链非编码RNA (long non-coding RNA, lncRNA) 曾被认为是基因组中没有功能的部分, 但近年来越来越多的研究数据证实, lncRNAs在宫颈癌的诊断和治疗中发挥着重要的作用, 其中包括结肠癌相关转录本2 (colon cancer-associated transcript 2, CCAT2)^[5]。CCAT2在多种肿瘤中呈现异常表达, 如乳腺癌、卵巢癌、宫颈癌等, 具有肿瘤标志物的潜在价值^[6]。本研究采用分子技术检测宫颈癌细胞中CCAT2的表达水平, 观察其对细胞增殖及周期的影响, 明确CCAT2的表达对宫颈癌细胞的作用。

1 材料与方法

1.1 细胞系及主要试剂

宫颈癌细胞系HeLa、C-33A和CaSki购自中国科学院上海细胞库。MEM、胎牛血清购自Gibco公司, RPMI 1640培养基购自Hyclone公司, TRIzol购自Ambion公司, 逆转录试剂盒购自TaKaRa公司, SYBR Green PCR试剂盒购自KAPA Biosystems公司, 载体pSICOR、pCDH-CMV-MCS-EF1-CopGFP-T2A-Puro购自Addgene公司, 内切酶XhoI、BamHI和XbaI购自NEB公司, Lipofectamine™2000购自Invitrogen公司, 细胞凋亡检测试剂盒购自BD公司, 兔抗Ki67抗体、细胞周期蛋白D1 (Cyclin D1) 抗体及周期蛋白依赖性激酶4 (cyclin-dependent kinase 4, CDK4) 抗体均购自武汉贝茵莱公司, PVDF膜、化学发光试剂购自Millipore公司。

1.2 细胞复苏与培养

将细胞从液氮罐中取出后, 在37℃水浴中解冻, 待冻存液完全融化后, 将细胞悬液转移至离心管中, 低速离心3 min。加入1 ml含10%胎牛血清的新鲜培养基重悬细胞, 转移至培养瓶中, 再加入4 ml培养基, 置于37℃、5% CO₂培养箱中培养。HeLa和C-33A细胞于含10%胎牛血清的MEM中培养, CaSki细胞于含10%胎牛血清的RPMI 1640正常培养基中培养。

1.3 qPCR法检测CCAT2表达

TRIzol提取细胞总RNA, 反转录为cDNA, 以cDNA为模板进行PCR扩增。PCR反应程序: 95℃预变性3 min; 95℃变性5 s, 56℃退火10 s, 72℃延伸25 s, 共39个循环。PCR引物由武汉天一辉远生物科技有限公司合成, 引物序列如下: CCAT2-F: CAAGAGGGAGG-TATCAACA; CCAT2-R: GCAATAAGAGCAGGAA AAGA; GAPDH-F: CCACTCCTCCACCTTTG; GAPDH-R: CACCACCCTGTTGCTGT。采用2^{-ΔΔCt}法计算CCAT2

相对表达水平。

1.4 构建CCAT2过表达及干扰载体

提取细胞RNA, 反转录合成cDNA, 设计引物进行PCR扩增获取目的基因片段, 引物序列如下: CCAT2-F, GCTCTAGACCGAGGTGATCAGGTGGA; CCAT2-R, CGGGATCCGTCTTCTGGGCTGATGTT。设计CCAT2干扰靶序列, 获取干扰基因片段。shCCAT2引物序列见表1。采用内切酶XhoI和BamHI双酶切过表达质粒, 采用BamHI和XbaI双酶切干扰质粒, 与目的基因重组, 筛选阳性表达重组质粒, 采用Lipofectamine™2000转染试剂, 将重组质粒DNA转入细胞中, 转染24 h后检测转染效率, 采用qPCR法检测细胞中CCAT2相对表达水平。

表1 shCCAT2引物序列

Tab.1 Primer sequences of shCCAT2

Primer	Sequence (5'-3')
shCCAT2-1	GCTAGGTATGCTAAAGTTTGC
shCCAT2-2	GCAGGAACCCAGCAAGTTTCT
shCCAT2-3	GCTACCAGCAGCACCATTTCA
shCCAT2-4	GCGCTGACAGAGATTGCTTAC

1.5 MTT法检测细胞活性

收集对数期细胞, 接种于96孔板中 (5×10³个细胞/孔) 培养过夜, 待细胞贴壁, 每种处理设置3个平行孔。将细胞分为5组: 对照组、干扰空载 (sh-EV) 组、过表达空载 (overExp-EV) 组、CCAT2干扰 (sh-CCAT2) 组、CCAT2过表达 (overExp-CCAT2) 组, 不同分组处理24 h后, 取出细胞培养板, 每孔加入20 μl浓度为5 mg/ml的MTT溶液, 继续培养4 h。弃上清, 每孔加入150 μl DMSO溶解液, 振荡溶解结晶物后, 于酶标仪上检测波长为490 nm处各孔的光密度 (D) 值。

1.6 流式细胞术检测细胞周期

分组处理24 h后的各组细胞经过0.25%胰酶于室温消化1 min左右, 制成单细胞悬液, 收集于流式专用管中, 取约5×10⁵个细胞/组。低速离心5 min, 弃上清, 加入300 μl含10%胎牛血清的PBS溶液悬浮细胞沉淀, 再加入700 μl无水乙醇, 于-20℃中固定24 h。取出固定样品, 1 572×g离心30 s, 弃上清。PBS洗涤2次后, 加入400 μl浓度为50 μg/ml的碘化丙啶溶液, 避光染核10 min, 流式细胞仪测定细胞DNA含量, 确定各细胞周期的细胞占比。

1.7 WB法检测Ki67、Cyclin D1及CDK4蛋白的表达水平

将各组细胞从培养箱中取出, PBS洗涤2次后, 加入裂解液裂解细胞, 95℃水浴加热10 min, 13 700×g

离心 10 min, 取上清进行蛋白定量。配制 12% 分离胶及浓缩胶, 以每孔上样量为 20 μg 蛋白进行电泳分离。湿转法将蛋白转移至 PVDF 膜, 采用 5% 脱脂奶粉封闭液室温封闭 2 h。加入一抗稀释液(稀释比 1:1 000), 室温孵育 1 h, PBST 洗涤 3 次后, 加入二抗稀释液(稀释比 1:10 000), 室温孵育 1 h。PBST 洗涤 3 次, 滴加化学发光试剂, 于暗室中曝光显影, 读取蛋白条带灰度值, 计算相对表达量。

1.8 统计学处理

上述实验均进行 3 次重复, 采用 SPSS 22.0 软件进行统计学分析, 正态分布的计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组均数间比较先行方差齐性检验后再行单因素方差分析, 两两比较采用 LSD 检验。以 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 筛选 CaSki 细胞为实验细胞

qPCR 法检测宫颈癌 HeLa、C-33A 和 CaSki 细胞中 CCAT2 的表达水平, 结果(图 1)显示, C-33A 细胞 CCAT2 表达水平明显低于 HeLa 细胞 ($P < 0.01$), 而 CaSki 细胞 CCAT2 表达水平明显高于 HeLa 细胞 ($P < 0.01$)。因此, 选择 CCAT2 表达水平最高的 CaSki 细胞作为后续实验的研究对象。

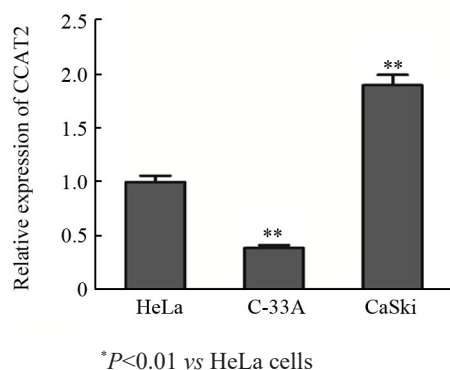


图 1 HeLa、C-33A 和 CaSki 细胞中 CCAT2 表达水平比较
Fig.1 Comparison of CCAT2 expression among HeLa, C-33A and CaSki cells

2.2 CCAT2 干扰及过表达载体对 CaSki 细胞 CCAT2 表达的影响

CCAT2 干扰或过表达载体转染 CaSki 细胞 24 h 后, 检测细胞中 CCAT2 表达水平, qPCR 检测结果(图 2)显示, 与对照组比较, 干扰或过表达空载体组细胞中 CCAT2 的表达水平差异无统计学意义 ($P > 0.05$), CCAT2 过表达组 CCAT2 的表达水平显著升高 ($P < 0.01$), 而干扰组则显著降低 ($P < 0.01$)。且 sh-CCAT2-3 靶序列的干扰效果最好, 故选择该靶序列进行后续实验。

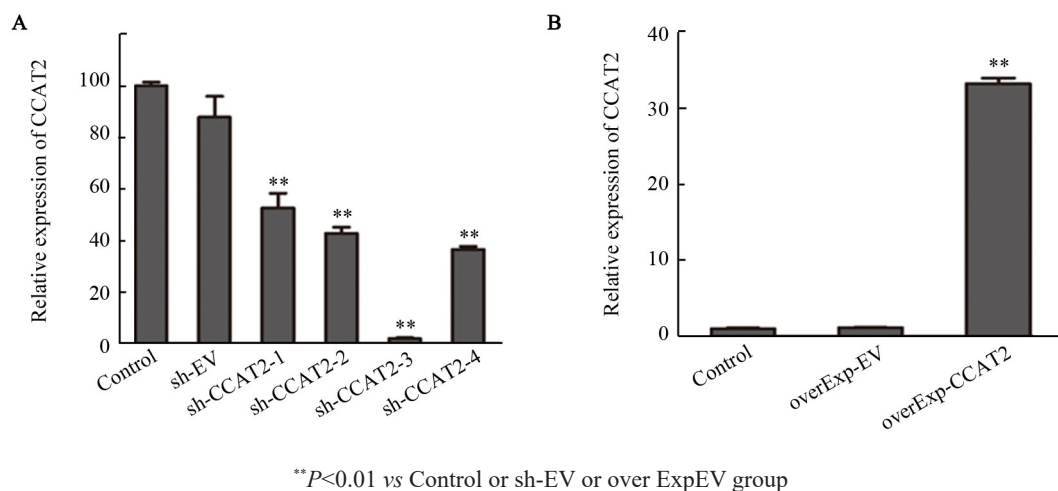


图 2 CCAT2 干扰(A)及过表达(B)效率检测
Fig.2 Detection of CCAT2 interference (A) and overexpression (B) efficiency

2.3 CCAT2 对 CaSki 细胞增殖能力的影响

MTT 法检测结果(图 3)显示, 与对照组相比, CCAT2 干扰组细胞活性显著减低, 增殖能力明显减弱 ($P < 0.01$), 而 CCAT2 过表达组细胞活性显著增加, 增殖能力明显增强 ($P < 0.01$)。

2.4 CCAT2 对 CaSki 细胞周期的影响

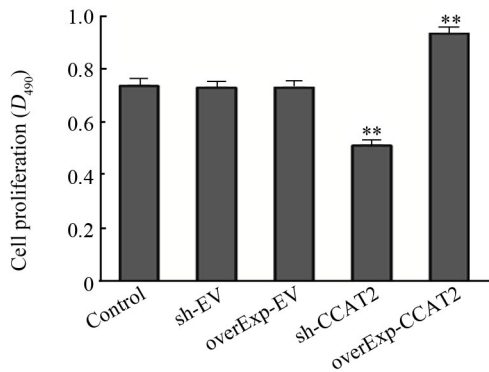
流式细胞术检测结果(图 4)显示, 与对照组相比, 空载体组、CCAT2 过表达组 G1 期细胞占比差异均

无统计学意义 ($P > 0.05$), 但 CCAT2 干扰组 G1 期细胞比例显著升高 ($P < 0.01$), 说明细胞周期阻滞在 G1 期。

2.5 CCAT2 对 CaSki 细胞增殖及周期相关蛋白表达的影响

WB 法检测 CaSki 细胞中增殖相关蛋白(Ki67)和周期相关蛋白(Cyclin D1、CDK4)的表达水平, 结果(图 5)显示, 与对照组相比, CCAT2 干扰组细胞中 Ki67、Cyclin D1、CDK4 蛋白相对表达量均显著降低

($P < 0.01$), 而 CCAT2 过表达组 Ki67、Cyclin D1、CDK4 蛋白的相对表达量显著升高 ($P < 0.01$)。



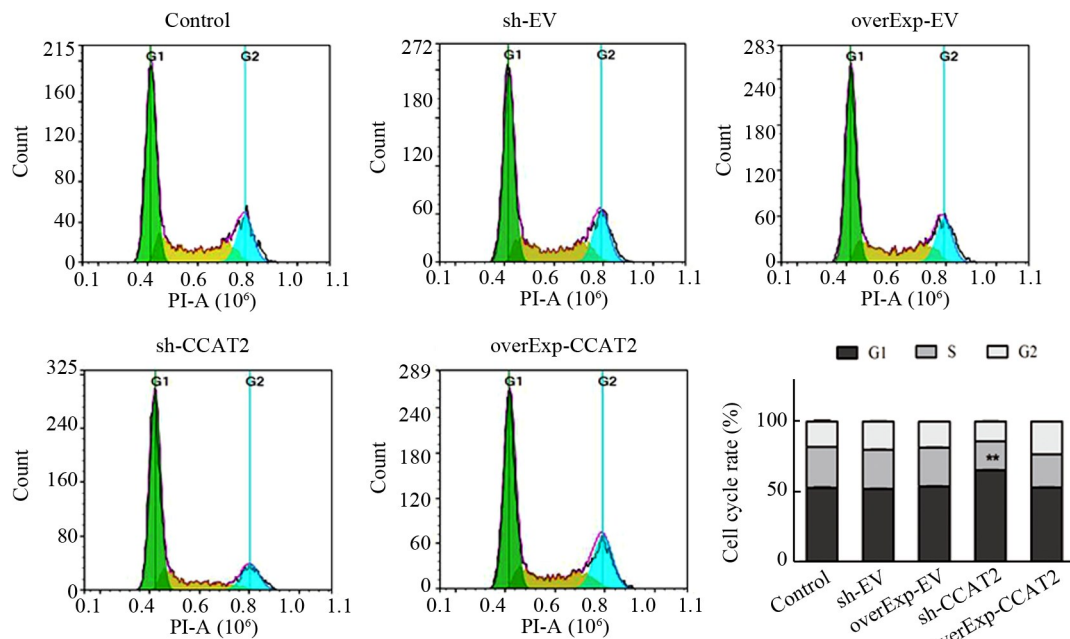
** $P < 0.01$ vs Control group

图3 MTT 法检测 CaSki 细胞的增殖能力
Fig.3 The proliferation of CaSki cells was detected by MTT assay

3 讨论

通过对基因组学的研究,人们发现可编码蛋白的 RNA 序列仅为人类基因组转录物很小的一部分,

更多的是缺乏编码能力的非编码 RNA,其中包括 miRNAs、lncRNAs 等,miRNAs 可通过降解 mRNAs 沉默基因的表达^[7],而 lncRNAs 介导的基因表达涉及到转录调控、蛋白修饰、蛋白复合物的形成等多种机制^[8]。因此,深入探究非编码 RNA 在人类疾病中的作用,有望改变相关疾病的治疗现状。研究发现,lncRNA FOXD2-AS1 可通过靶向 miR-506-5p 的表达对宫颈癌细胞的增殖和凋亡发挥调控作用^[9]。周莉等^[10]结果也显示了 lncRNA MALAT1 靶向 miR-124-3p/IGF2BP1 分子轴促进宫颈癌细胞的增殖、侵袭以及上皮间质转化。上述研究结果提示多种 lncRNA 参与宫颈癌细胞的生物学行为。CCAT2 是一种包含与癌症相关的 rs6983267 单核苷酸多态性 (single nucleotide polymorphisms, SNP) 区域的新型 lncRNA,位于基因座 8q24,由 1 752 个核苷酸组成^[11]。CCAT2 在多种癌症细胞中表达异常升高,通过复杂的癌症调控网络在癌细胞的增殖、迁移、侵袭与凋亡等过程中发挥重要作用^[12]。通过临床数据 Meta 分析,提示 CCAT2 与癌症存在密切关系,可能是一种潜在的新的癌症标记物^[13]。



** $P < 0.01$ vs Control group

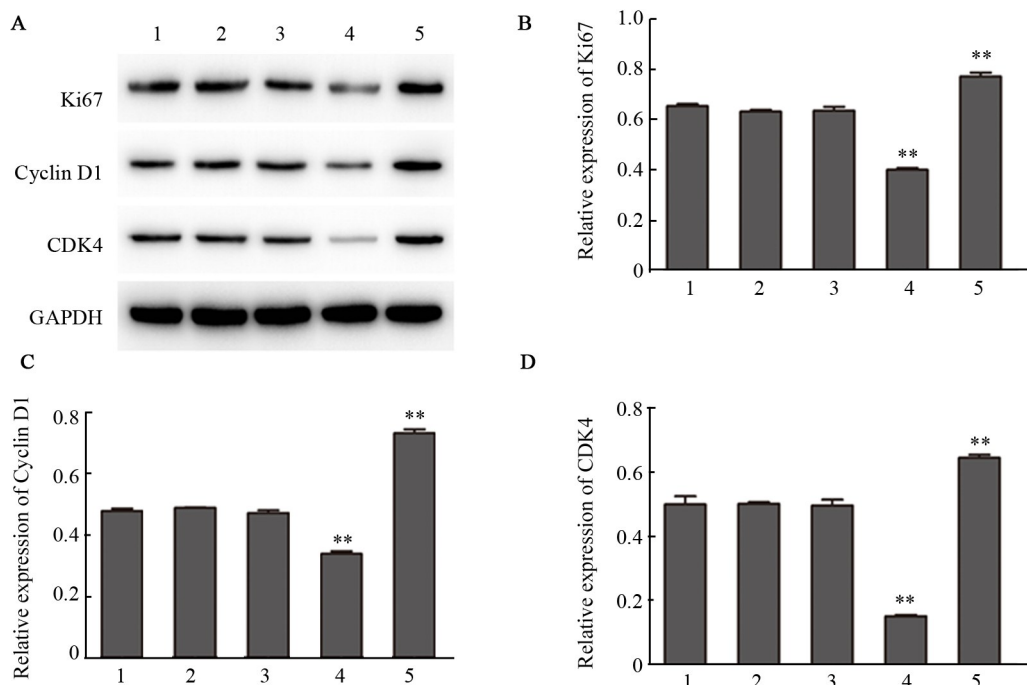
图4 流式细胞术检测 CCAT2 对各组 CaSki 细胞周期的影响
Fig.4 Effect of CCAT2 on CaSki cell cycle was detected by Flow cytometry

细胞增殖是肿瘤发生发展的重要环节之一,癌细胞实现了永久复制,缺乏正常的生长控制^[14]。Ki67 是一种肿瘤细胞增殖标记物,其表达水平反映了细胞的增殖活性,与肿瘤的恶性程度紧密相关,具有一定的临床肿瘤诊断和预后预测价值^[15]。细胞周期运

转是细胞维持正常生命活动的基本过程之一,控制着细胞从静止期进入生长增殖期,而当细胞周期调控异常时,往往与细胞癌变发生关联^[16]。Cyclin D1 是一种细胞周期蛋白,可促使细胞快速通过细胞周期,从而加快细胞增殖^[17]。CDK4 是细胞进入增殖周

期第一个被激活的蛋白激酶,与 Cyclin D1 结合后形成具有活性的 Cyclin D1/CDK4 复合物,促进细胞从 G1 期进入 S 期^[18]。相关研究^[19]结果亦证实,当 Cyclin D1、CDK4 失活后,可诱导细胞周期阻滞在 G0/G1 期。本研究检测了 3 种宫颈癌细胞(HeLa、C-33A 和 CaSki)中 CCAT2 的表达水平,挑选表达水平最高的 CaSki 细胞作为实验材料,观察不同水平 CCAT2 对细胞

增殖的影响,结果显示 CCAT2 表达干扰后,细胞活力降低,增殖能力减弱,且 Ki67 表达下调;进一步检测细胞周期,显示 CCAT2 表达干扰后,G1 期细胞占比增多,发生 G1 期阻滞现象。细胞中 Cyclin D1 和 CDK4 表达下调正好解释了周期阻滞现象,而当 CCAT2 过表达后,各检测指标趋势相反。



**P<0.01 vs Control group

1: Control; 2: sh-EV; 3: overExp-EV; 4: sh-CCAT2; 5: overExp-CCAT2

图5 WB法检测(A)CaSki细胞中Ki67(B)、Cyclin D1(C)、CDK4(D)蛋白表达

Fig.5 The protein expressions of Ki67 (B), Cyclin D1 (C) and CDK4 (D) in CaSki cells were detected by WB (A)

本研究结果说明了 CCAT2 在宫颈癌细胞中可促进细胞增殖,抑制 CCAT2 后可促使细胞发生 G1 期阻滞,从而影响宫颈癌细胞的增殖,提示 CCAT2 在宫颈癌中发挥癌基因功能,可调控细胞增殖及周期相关蛋白的表达水平,推测抑制 CCAT2 表达可能是宫颈癌靶向治疗的新方向。

[参考文献]

[1] BRAY F, FERLAY J, SOERJOMATARAM I, et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. CA Cancer J Clin, 2018, 68:394-424. DOI:10.3322/caac.21492.

[2] MUKAKALISA I, BINDLER R, ALLEN C, et al. Cervical cancer in developing countries: effective screening and preventive strategies with an application in Rwanda[J]. Health Care Women Int, 2014, 35 (7/8/9): 1065-1080. DOI:10.1080/07399332.2014.909433.

[3] SMALL W J, BACON M A, BAJAJ A, et al. Cervical cancer: A global health crisis[J]. Cancer, 2017, 123(13): 2404-2412. DOI: 10.1002/cncr.30667.

[4] ANTONIO D F, MARIA G L, ELIANE C. Prospects of molecularly-targeted therapies for cervical cancer treatment[J]. Curr Drug Targets, 2015, 16(1):77-91. DOI: 10.2174/1389450116666141205150942.

[5] DONG J X, SU M M, CHANG W Q, et al. Long non-coding RNAs on the stage of cervical cancer (Review)[J]. Oncol Rep, 2017, 38 (4): 1923-1931. DOI:10.3892/or.2017.5905.

[6] 张培培, 刘巍, 李委佳, 等. 长链非编码 RNA CCAT2 在肿瘤中的研究进展[J]. 国际免疫学杂志, 2017, 40(5):576-580.10.3760/cma.j.issn.1673-4394. 2017.05.023.

[7] HAYES J, PERUZZI P P, LAWLER S. MicroRNAs in cancer: bio-markers, functions and therapy[J]. Trends Mol Med, 2014, 20(8): 460-469. DOI:10.1016/j.molmed.2014.06.005.

[8] PENG W X, KOIRALA P, MO Y Y. LncRNA-mediated regulation of cell signaling in cancer[J/OL]. Oncogene, 2017, 36(41): 5661-5667[2019-12-20]. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6450570/.

[9] 王婷, 郭朋, 曹爱娥. lncRNA FOXD2-AS1 通过靶向 miR-506-5p 调控宫颈癌细胞增殖与凋亡[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2019,26 (10):1068-1074.DOI:10.3872/j.issn.1007-385x. 2019.10.003.

[10] 周莉, 秦娟, 陆安伟. LncRNA MALAT1 通过调控 miR-124-3p/

- IGF2BP1分子轴促进宫颈癌细胞增殖和转移[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2019, 26(2): 52-59. DOI:10.3872/j.issn.1007-385X.2019.02.007.
- [11] LING H, SPIZZO R, ATLASI Y, et al. CCAT2, a novel noncoding RNA mapping to 8q24, underlies metastatic progression and chromosomal instability in colon cancer[J/OL]. *Genome Res*, 2013, 23(9): 1446-1461[2019-12-10]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3759721/>. DOI:10.1101/gr.152942.112.
- [12] 莫娇, 李子涵, 于水灵, 等. 长链非编码RNA CCAT2与癌症[J]. *生命科学*, 2018, 30(11): 102-107. DOI:10.13376/j.cbls/2018151.
- [13] JING X, LIANG H P, CUI X R, et al. Long noncoding RNA CCAT2 can predict metastasis and a poor prognosis: a meta-analysis [J]. *Clin Chim Acta*, 2017, 468: 159-165. DOI:10.1016/j.cca.2017.03.003.
- [14] FEITELSON M A, ARZUMANYAN A, KULATHINAL R J, et al. Sustained proliferation in cancer: mechanisms and novel therapeutic targets[J/OL]. *Semin Cancer Biol*, 2015, 35(Suppl): S25-S54[2019-12-25]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4898971/>. DOI:10.1016/j.semcancer.2015.02.006.
- [15] 陈梦云, 张翠翠, 轩菡, 等. Ki67在肿瘤中的表达及其临床指导意义[J]. *现代生物医学进展*, 2015, 15(16): 3193-3196. DOI:10.13241/j.cnki.pmb.2015.16.049.
- [16] 付文锋, 刘天初. 细胞周期抑制剂治疗肿瘤的进展[J]. *实用临床医学*, 2015, 16(10): 97-101. DOI:10.13764/j.cnki.lcsy.2015.10.041.
- [17] CHEN J, LI X, CHENG Q, et al. Effects of cyclin D1 gene silencing on cell proliferation, cell cycle, and apoptosis of hepatocellular carcinoma cells[J]. *J Cell Biochem*, 2018, 119(2): 2368-2380. DOI:10.1002/jcb.26400.
- [18] 张影, 廖祥志, 范传玺, 等. 靶向Cyclin D1/CDK4激酶复合物胞内抗体的生物学作用:“中国酶工程与糖生物工程学术研讨会”论文集[C]. 北京:中国微生物学会酶工程专业委员会, 2015.
- [19] LI J J, GUO L, TIAN Z Z, et al. Half-sandwich iridium and ruthenium complexes: effective tracking in cells and anticancer studies[J]. *Inorg Chem*, 2018, 57(21): 13552-13563. DOI:10.1021/acs.inorgchem.8b02161.

[收稿日期] 2020-01-02

[修回日期] 2020-05-15

[本文编辑] 阮芳铭