

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2020.08.006

· 基础研究 ·

二甲双胍抑制多柔比星诱导的胃癌 BGC823 细胞衰老及其相关分泌表型

黄禾菁^a, 张鑫^{b▲}, 朱振新^b, 卫子然^b, 杨德君^b, 蔡清萍^b(海军军医大学 长征医院 a. 超声科; b. 胃肠外科, 上海 200003)

[摘要] **目的:**探讨二甲双胍对多柔比星诱导的胃癌 BGC823 细胞衰老相关分泌表型 (senescence-associated secretory phenotype, SASP) 的影响。**方法:**体外培养人胃癌 BGC823 细胞,以梯度浓度 (50、100、150 和 200 nmol/L) 的多柔比星处理,SA-β-gal 染色检测细胞衰老,ELISA 检测 SASP 因子的分泌。在 100 nmol/L 多柔比星诱导胃癌细胞衰老模型中加入梯度浓度 (0、5、10、20 mmol/L) 的二甲双胍,观察二甲双胍对多柔比星诱导的细胞衰老、SASP 相关因子分泌的影响。**结果:**随着多柔比星的浓度和处理时间的增加,胃癌 BGC823 细胞衰老比例呈现先升后降的趋势,以 100 nmol/L 多柔比星处理 96 h 后的衰老细胞比例达到峰值 (68.7%),伴随 SASP 相关因子 IL-1α、IL-6、IL-8、CXCL1 表达的显著增加。在 5、10 和 20 mmol/L 的二甲双胍作用下,衰老细胞的比例依次为 (55.2±1.9)%、(48.7±2.2)% 和 (40.8±2.3)%;与单纯诱导衰老组相比,均有显著降低 ($P<0.01$)。同时,随着加入二甲双胍浓度的增加,SASP 相关因子 IL-1α、IL-6、IL-8 和 CXCL1 的产生均呈现梯度下降的表现。与单纯诱导衰老组相比,IL-6 和 IL-8 在 10 mmol/L 以上浓度的二甲双胍作用下显著降低 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$),而 IL-1α 和 CXCL1 在 20 mmol/L 二甲双胍作用下显著降低 (均 $P<0.05$)。**结论:**二甲双胍能够抑制多柔比星诱导的胃癌细胞衰老及 SASP 效应。

[关键词] 胃癌;细胞衰老;细胞衰老相关分泌表型;二甲双胍;氧化应激

[中图分类号] R735.2;R730.53; R730.58 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385X(2020)08-0874-05

Metformin inhibits the senescence and senescence-associated secretory phenotype of gastric cancer BGC823 cells induced by doxorubicin

HUANG Hejing^a, ZHANG Xin^{b▲}, ZHU Zhenxin^b, WEI Ziran^b, YANG Dejun^b, CAI Qingping^b (a. Department of Ultrasound; b. Department of Gastrointestinal Surgery, Changzheng Hospital, Naval Military Medical University, Shanghai 200003, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect of metformin on the senescence-associated secretory phenotype (SASP) of doxorubicin-induced gastric cancer BGC823 cells. **Methods:** Human gastric cancer BGC823 cells were cultured *in vitro* and treated with doxorubicin at gradient concentrations (50, 100, 150 and 200 nmol/L). Cell senescence was detected by SA-β-gal staining, and SASP factor expression was detected by ELISA. The effects of metformin on cell senescence and SASP factor secretion induced by doxorubicin (100 nmol/L) were observed by adding gradient concentrations of metformin (0, 5, 10 and 20 mmol/L). **Results:** With the increase of doxorubicin concentration and treatment time, the senescence rate of gastric cancer BGC823 cells increased first and then decreased. At 96 h after 100 nmol/L doxorubicin treatment, the peak aging rate reached 68.7%, accompanied with significantly increased expressions of SASP factors IL-1α, IL-6, IL-8 and CXCL1. The proportion of senescent cells was (55.2±1.9)%, (48.7±2.2)% and (40.8±2.3)% respectively under the effects of 5, 10 and 20 mmol/L metformin, which was significantly lower than that in the non-metformin treatment group ($P<0.01$). At the same time, with the increase of metformin concentration, the production of SASP factors IL-1α, IL-6, IL-8 and CXCL1 showed a gradient decline. Compared with the non-metformin treatment group, IL-6 and IL-8 decreased significantly under the effect of metformin above 10 mmol/L ($P<0.05$ or $P<0.01$), while IL-1α and CXCL1 decreased significantly under the effect of 20 mmol/L metformin (all $P<0.05$). **Conclusion:** Metformin can inhibit the senescence and SASP production of gastric cancer cells induced by doxorubicin.

[Key words] gastric cancer; cell senescence; senescence-associated secretory phenotype; metformin; oxidative stress

[Chin J Cancer Biother, 2020, 27(8): 874-878. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2020.08.006]

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目 (No. 81602617, 81773049); 上海长征医院金字塔人才工程国家“优青”后备人才计划资助。Project supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 81602617, 81773049), and the National “Excellent Youth” Reserve Talent Plan of “Pyramid Talent Project” of Shanghai Changzheng Hospital

[作者简介] 黄禾菁 (1987-), 女, 博士, 主治医师、讲师, 主要从事肿瘤分子影像学相关研究, E-mail: huanghejianga@163.com; 张鑫 (1986-), 男, 博士, 主治医师、讲师, 主要从事肿瘤的分子免疫学相关研究, E-mail: czzx86@163.com。▲为共同第一作者

[通信作者] 蔡清萍 (CAI Qingping, corresponding author), 博士, 主任医师、教授, 博士生导师, 主要从事胃肠道肿瘤的精准治疗相关研究, E-mail: caiqingping@smmu.edu.cn

胃癌是消化系统常见且高度恶性的肿瘤, 总体预后较差^[1]。随着D2根治手术的规范性开展以及各种新型化疗药物的应用, 其临床疗效得到显著提高^[2]。然而, 即使在得到根治性切除且接受了规范的辅助性化疗的情况下, 仍有部分患者出现肿瘤的复发和转移, 提示现有治疗手段的局限性。事实上, 常规化疗在杀伤肿瘤的同时, 还会诱导部分肿瘤细胞发生衰老, 衰老的细胞不仅本身对化疗产生抵抗, 还可以通过分泌大量生物活性物质诱导其他肿瘤细胞对化疗产生耐药^[3]。这些由衰老细胞分泌的生物活性物质被称为衰老相关分泌表型(senescence-associated secretory phenotype, SASP), 其通过自分泌或旁分泌的方式对细胞微环境产生重要影响, 被认为是导致肿瘤化疗耐药的关键因素^[4-5]。

二甲双胍作为一种传统的口服降糖药, 其在调节人体能量代谢中的安全性和有效性已得到广泛的认同。与此同时, 流行病学研究^[6]发现, 在糖尿病增加总体肿瘤发病风险的大背景下, 口服二甲双胍者的肿瘤发病率却显著降低, 提示二甲双胍有潜在的抗肿瘤作用^[7]。近年来, 陆续有相关的研究证实二甲双胍与化疗药物联用具有增敏、逆转耐药的作用, 但具体机制尚不清楚。本研究旨在探索二甲双胍对多柔比星诱导的人胃癌BGC823细胞衰老及SASP的影响, 并对其机制进行初步探讨, 从而为逆转胃癌化疗耐药提供新思路。

1 材料与方法

1.1 主要材料与试剂

胃癌BGC823细胞购自中科院细胞库, 采用含10%胎牛血清的DMEM培养基, 置于5%CO₂、37℃培养箱中培养, 采用2.5 g/L胰酶+0.02% EDTA进行细胞传代, 每3~5 d传代一次, 选取对数生长期细胞进行后续实验。

衰老细胞β半乳糖苷酶染色试剂盒购自碧云天生物技术公司, 多柔比星购自上海生工公司, 二甲双胍购自Sigma公司, RPMI 1640培养基、胎牛血清、胰酶均购自Hyclone公司, IL-6、IL-8、IL-1α和CXCL1 Elisa试剂盒均购自上海酶联公司, MTS购自Promega公司, FlexStation3多功能酶标仪检测购自美谷分子仪器公司。

1.2 多柔比星诱导BGC823细胞衰老模型

将对数生长期的BGC823细胞接种于6孔板(1.2×10⁴个/孔), 分组后分别用梯度浓度(50、100、150和200 nmol/L)多柔比星处理24 h, 随后换不含多柔比星的培养基培养, 继续培养24、48、72、96 h后进行SA-β-gal染色。

1.3 SA-β-gal染色鉴定BGC823细胞衰老模型

吸除细胞培养液, PBS清洗1次, 加入1 ml SA-β-gal染色固定液, 室温固定15 min后吸除细胞固定液, PBS清洗细胞3次, 每次3 min。吸除PBS后每孔加入1 ml SA-β-gal染色工作液, 保鲜膜封住6孔板防止蒸发, 37℃孵育过夜。普通光学显微镜下观察, 细胞内染色呈绿色的为衰老细胞, 随机选取3个视野, 分别计数300个细胞, 计算衰老细胞的百分比。

1.4 ELISA检测BGC823细胞培养上清中IL-1α、IL-6、IL-8、CXCL1的浓度

吸取BGC823细胞培养基, 1 000×g离心20 min, 取上清, 采用ELISA法检测其中IL-1α、IL-6、IL-8、CXCL1的浓度。设置标准品孔和样本孔, 标准品孔各加不同浓度的标准品50 μl, 样本孔中加入待测样本50 μl, 空白孔不加样, 用封板胶纸封住反应孔, 室温孵育120 min。除空白孔外, 标准品孔和样本孔中每孔加入按说明书要求稀释的辣根过氧化物酶标记的检测抗体100 μl, 封住板孔, 37℃水浴温育60 min。弃去液体, 重复洗板5次。加入底物A、B液各50 μl后37℃避光孵育15 min。加入终止液50 μl, 酶标仪测定450 nm波长处各孔的光密度(D)值, 画出标准曲线, 计算出样本中待测指标的浓度, 不同组别间以相对浓度比值做统计学分析。

1.5 MTS法检测多柔比星对BGC823细胞增殖的影响

96孔板接种对数生长期BGC823细胞(5×10³个/孔), 常规培养96 h作为阳性对照组。实验组BGC823细胞给予梯度浓度(50、100、150和200 nmol/L)多柔比星处理24 h后改用不含多柔比星的培养基再进行常规培养72 h。空白对照组仅加入同等体积的培养基。MTS检测时于每孔加入20 μl MTS溶液, 轻震混匀, 静置于细胞培养箱避光孵育2 h后酶标仪检测490和690 nm波长处光密度(D)值并计算各孔D_{490/690}值, 进一步计算细胞存活率。细胞存活率=(实验组D_{490/690}值-空白对照组D_{490/690}值)/(阳性对照组D_{490/690}值-空白对照组D_{490/690}值)×100%。

1.6 SA-β-gal染色和ELISA检测二甲双胍对BGC823细胞衰老和SASP相关因子水平的影响

将对数生长期的BGC823细胞接种于6孔板(1.2×10⁴个/孔), 加入多柔比星至100 nmol/L, 同时加入浓度依次为0、5、10和20 mmol/L的二甲双胍处理BGC-823细胞24 h, 随后换为不含多柔比星而仅含有与之前同等浓度二甲双胍的培养基培养, 继续培养72 h后进行SA-β-gal染色和ELISA检测细胞衰老情况和培养上清中SASP相关因子的水平。

1.7 统计学处理

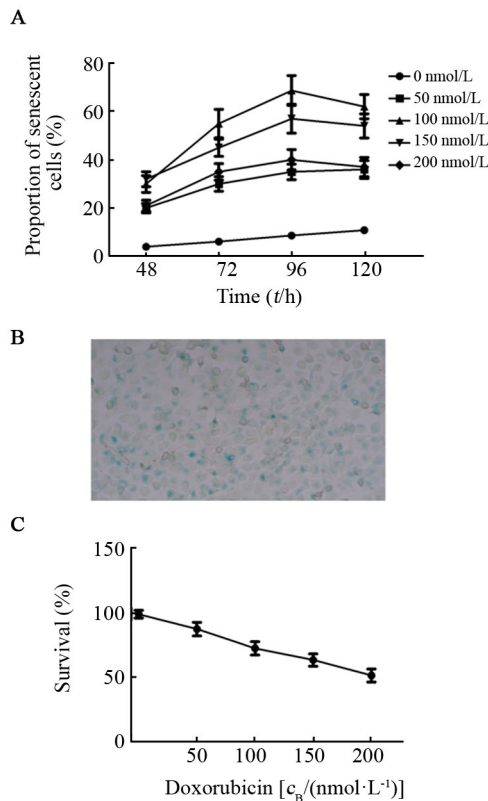
采用SPSS 17.0软件进行数据处理, 所有实验独

立重复3次,呈正态分布的计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,组间差异比较采用两独立样本 t 检验,取 $\alpha=0.05$ 作为检验水准,以 $P<0.05$ 或 $P<0.01$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 多柔比星诱导成功构建BGC823细胞衰老模型

SA- β -gal染色结果(图1A、B)显示,随着药物浓度的递增和时间的推移,衰老细胞的比例呈现先升后降的变化趋势,100 nmol/L多柔比星处理组在96 h时衰老细胞的比例最高,达68.7%。MTS检测结果(图1C)显示,96 h时100 nmol/L处理组细胞的存活率在72%,提示多柔比星诱导胃癌细胞衰老模型构建成功,因此选用96 h时的衰老细胞模型进行后续实验。



A: Proportion of senescent cells under gradient concentrations of doxorubicin treatment at different time points; B: Cell senescence was detected by SA- β -gal staining at 96 h after 100 nmol/L doxorubicin treatment ($\times 100$); C: MTS was used to detect cell survival

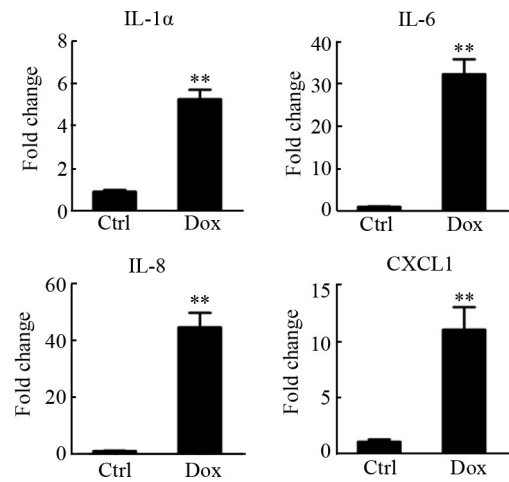
图1 多柔比星诱导构建胃癌BGC823细胞衰老模型

Fig.1 The establishment of Doxorubicin-induced senescence model of gastric cancer BGC823 cells

2.2 多柔比星诱导BGC823细胞分泌SASP相关因子

ELISA检测多柔比星诱导的衰老BGC823细胞模型培养上清中SASP因子的表达,结果(图2)显示,与对照组相比,多柔比星组BGC823细胞培养上清中SASP因子IL-1 α 、IL-6、IL-8、CXCL1的表达水平显著

升高(均 $P<0.01$)。



** $P<0.01$ vs Ctrl group

BGC823 cells were treated with 100 nmol/L doxorubicin for 24 h.

After 96 h, the expression of SASP factor IL-1 α , IL-6, IL-8 and

CXCL 1 in supernatant were detected by ELISA

图2 多柔比星诱导胃癌BGC823细胞SASP现象

Fig.2 Doxorubicin-induced SASP in gastric cancer BGC823 cells

2.3 二甲双胍抑制多柔比星诱导的BGC823细胞衰老及SASP相关因子的产生

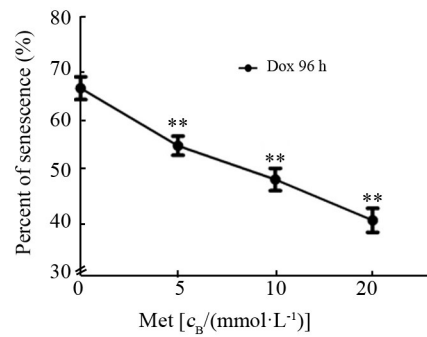
梯度浓度的二甲双胍加入多柔比星诱导的BGC823细胞衰老模型中,SA- β -gal染色后观察结果(图3)显示,在5、10和20 mmol/L二甲双胍作用下,衰老细胞的比例依次为(55.2 \pm 1.9)%、(48.7 \pm 2.2)%和(40.8 \pm 2.3)%,与单纯诱导衰老组(66.4 \pm 2.2)%相比,均显著降低(均 $P<0.01$)。同时,ELISA检测细胞上清中SASP相关因子的表达,结果(图4)显示,随着加入二甲双胍浓度的增加,SASP相关因子IL-1 α 、IL-6、IL-8和CXCL1的水平均呈现梯度下降的趋势;与单纯诱导衰老组相比,IL-6和IL-8在10 mmol/L以上浓度的二甲双胍作用下其分泌水平均显著降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$),而IL-1 α 和CXCL1在20 mmol/L二甲双胍作用下其分泌水平均显著降低(均 $P<0.05$)。

3 讨论

化疗诱导的细胞衰老及其SASP在胃癌化疗耐药中发挥重要作用,但SASP的发生机制不清^[8]。新近研究发现,衰老与内质网应激(endoplasmic reticulum stress, ERS)及其伴随的未折叠蛋白反应(unfolded protein reaction, UPR)高度相关,被认为是SASP的启动因素^[9]。二甲双胍作为一种传统的口服降糖药,其UPR阻断效应在抗肿瘤治疗尤其是逆转肿瘤化疗耐药中受到广泛关注^[10],然而二甲双胍是否能够抑制化疗药物诱导的衰老及SASP目前尚不明确。

本研究发现以 100 nmol/L 多柔比星诱导细胞 24 h 后继续培养 72 h 可构建衰老细胞模型, 且 SASP 因子分泌水平达到峰值; 进一步发现, 二甲双胍能够显著抑制多柔比星诱导的细胞衰老, 并降低 SASP 的分泌。推测二甲双胍可能通过阻断 UPR, 进而抑制下游的衰老及 SASP, 从而对多柔比星诱导的胃癌细胞耐药具有潜在的治疗作用。

化疗诱导的细胞衰老及其伴随的 SASP 是近年来肿瘤学研究中的热点^[11-12]。对于整个机体而言, SASP 有双向调节作用^[13], 一方面通过正反馈加强细胞衰老信号的转导以促进肿瘤细胞生长停滞; 另一方面, SASP 的成分包括大量炎症介质和酶类, 这些生物活性物质被分泌到细胞外基质中, 影响肿瘤微环境的组成, 并成为肿瘤化疗耐药及复发、进展的重要推手^[14, 14]。因此, SASP 被认为是逆转化疗耐药的重要生物学靶点。

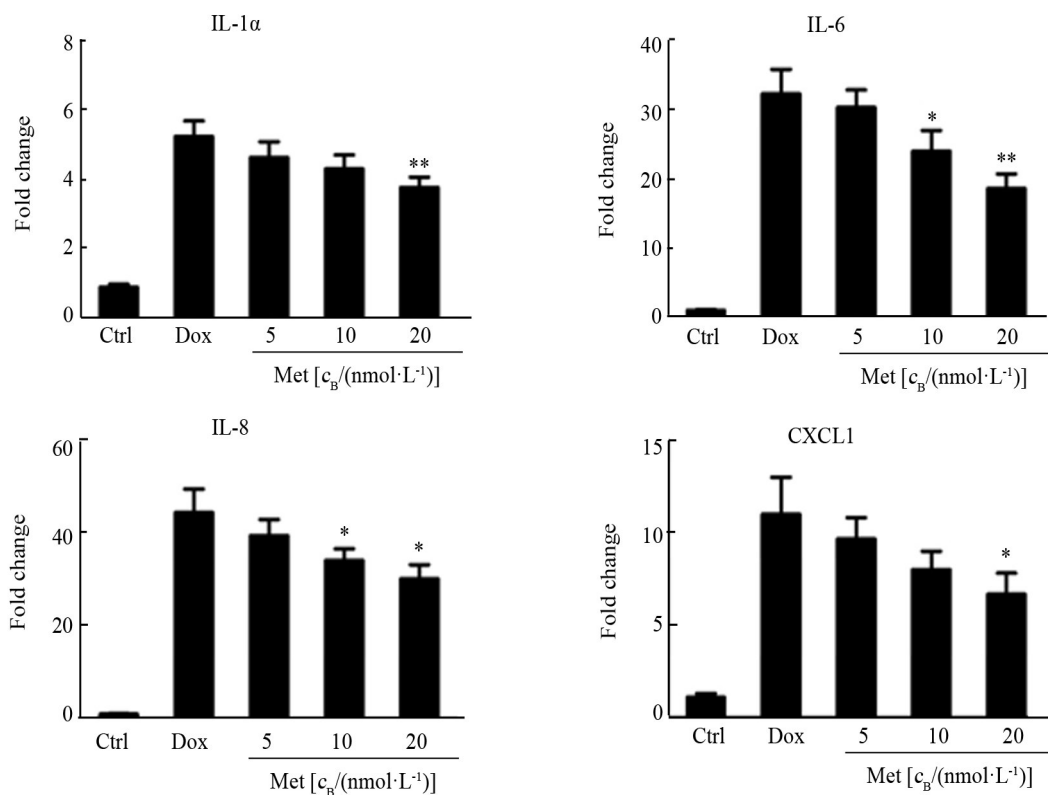


**P<0.01 vs 0 mmol/L group

Gradient concentrations of metformin were added to doxorubicin-induced BGC823 cell senescence model, and SA-β-gal staining was used to detect cell senescence

图3 二甲双胍抑制多柔比星诱导的胃癌细胞衰老

Fig.3 Metformin inhibited doxorubicin-induced senescence of gastric cancer cells



*P<0.05, **P<0.01 vs Dox group

图4 二甲双胍抑制多柔比星诱导的胃癌细胞SASP现象

Fig.4 Metformin inhibited the SASP induced by doxorubicin in gastric cancer cells

二甲双胍是一种经典的降糖药, 其最早于 2005 年被报道具有潜在的抗肿瘤效应^[15], 随后, 陆续有相关的临床研究及 meta 分析等发表证实这一临床假说^[16-17]。近年来, 对于二甲双胍的抗肿瘤机制研究亦取得了一定的进展。KATO 等^[18]较早通过体内和体外实验研究了二甲双胍对不同胃癌细胞系的作用, 发现其

能够以剂量依赖的方式抑制细胞增殖。HNF-4α 的上调表达是胃癌发生中的一个重要分子事件, 二甲双胍可能通过激活 AMPK 通路进而抑制 HNF4α 的活性, 发挥抑制上皮间充质转化的作用^[19]。与此同时, SONG 等^[20]的研究也提示, 二甲双胍可能通过 AMPK 通路抑制 Shh 信号通路, 从而发挥抗肿瘤作用。HAN

等^[21]研究发现,二甲双胍通过激活 AMPK,进而抑制 mTORC1 分子,最终实现抑制存活素而促进凋亡的生物学效应。此外,二甲双胍还被发现具有抑制肿瘤干细胞的作用^[22]。本研究发现,二甲双胍能够显著抑制多柔比星诱导的细胞衰老,并降低 IL-1 α 、IL-6、IL-8 及 CXCL1 等 SASP 效应因子的分泌,这一发现有助于从控制肿瘤相关炎症的角度揭示二甲双胍的抗肿瘤效应,也为研发相关的抗肿瘤药物提供了新思路。

综上所述,二甲双胍能够抑制多柔比星诱导的胃癌 BGC823 细胞衰老及 SASP 效应,有望成为逆转胃癌化疗耐药的潜在辅助性治疗药物。

[参考文献]

- [1] CHEN W Q, ZHENG R S, BAADE P D, et al. Cancer statistics in China, 2015[J]. CA: A Cancer J Clin, 2016, 66(2): 115-132. DOI: 10.3322/caac.21338.
- [2] VAN CUTSEM E, SAGAERT X, TOPAL B, et al. Gastric cancer[J]. Lancet, 2016, 388(10060): 2654-2664. DOI: 10.1016/s0140-6736(16)30354-3.
- [3] GUILLON J, PETIT C, TOUTAIN B, et al. Chemotherapy-induced senescence, an adaptive mechanism driving resistance and tumor heterogeneity[J]. Cell Cycle, 2019, 18(19): 2385-2397. DOI: 10.1080/15384101.2019.1652047.
- [4] LABERGE R M, SUN Y, ORJALO A V, et al. mTOR regulates the pro-tumorigenic senescence-associated secretory phenotype by promoting IL1A translation[J]. Nat Cell Biol, 2015, 17(8): 1049-1061. DOI:10.1038/ncb3195.
- [5] ZHANG B Y, FU D, XU Q X, et al. The senescence-associated secretory phenotype is potentiated by feedforward regulatory mechanisms involving Zscan4 and TAK1[J/OL]. Nat Commun, 2018, 9(1): 1723[2019-10-01]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5928226/>. DOI:10.1038/s41467-018-04010-4.
- [6] SHI Y K, HU F B. The global implications of diabetes and cancer[J]. Lancet, 2014, 383(9933): 1947-1948. DOI:10.1016/S0140-6736(14)60886-2.
- [7] NOTO H, GOTO A, TSUJIMOTO T, et al. Cancer risk in diabetic patients treated with metformin: a systematic review and meta-analysis[J/OL]. PLoS One, 2012, 7(3): e33411[2016-02-05]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3308971/>. DOI: 10.1371/journal.pone.0033411.
- [8] CHIEN Y C, SCUOPPO C, WANG X W, et al. Control of the senescence-associated secretory phenotype by NF- κ B promotes senescence and enhances chemosensitivity[J]. Genes Dev, 2011, 25(20): 2125-2136. DOI:10.1101/gad.17276711.
- [9] KIM H S, KIM Y, LIM M J, et al. The p38-activated ER stress-ATF6 α Axis mediates cellular senescence[J]. FASEB J, 2019, 33(2): 2422-2434. DOI:10.1096/fj.201800836R.
- [10] DREHER L S, HOPPE T. ERADicate tumor progression with metformin[J]. Mol Cell, 2018, 71(4): 481-482. DOI:10.1016/j.molcel.2018.08.001.
- [11] CAPELL B C, DRAKE A M, ZHU J J, et al. MLL1 is essential for the senescence-associated secretory phenotype[J]. Genes Dev, 2016, 30(3): 321-336. DOI:10.1101/gad.271882.115.
- [12] LAGUNAS A M, FRANCIS M, MANIAR N B, et al. Paracrine interaction of cancer stem cell populations is regulated by the senescence-associated secretory phenotype (SASP)[J]. Mol Cancer Res, 2019, 17(7): 1480-1492. DOI:10.1158/1541-7786.MCR-18-1356.
- [13] LAU L, DAVID G. Pro- and anti-tumorigenic functions of the senescence-associated secretory phenotype[J]. Expert Opin Ther Targets, 2019, 23(12): 1041-1051. DOI:10.1080/14728222.2019.1565658.
- [14] MO J, SUN B C, ZHAO X L, et al. Hypoxia-induced senescence contributes to the regulation of microenvironment in melanomas[J]. Pathol Res Pract, 2013, 209(10): 640-647. DOI: 10.1016/j.prp.2013.07.004.
- [15] EVANS J M, DONNELLY L A, EMSLIE-SMITH A M, et al. Metformin and reduced risk of cancer in diabetic patients[J]. BMJ, 2005, 330(7503): 1304-1305. DOI:10.1136/bmj.38415.708634.F7.
- [16] GANDINI S, PUNTONI M, HECKMAN-STODDARD B M, et al. Metformin and cancer risk and mortality: a systematic review and meta-analysis taking into account biases and confounders[J]. Cancer Prev Res (Phila), 2014, 7(9): 867-885. DOI:10.1158/1940-6207.CAPR-13-0424.
- [17] LEE C K, JUNG M, JUNG I, et al. Cumulative metformin use and its impact on survival in gastric cancer patients after gastrectomy [J]. Ann Surg, 2016, 263(1): 96-102. DOI: 10.1097/SLA.0000000000001086.
- [18] KATO K, GONG J, IWAMA H, et al. The antidiabetic drug metformin inhibits gastric cancer cell proliferation in vitro and in vivo[J]. Mol Cancer Ther, 2012, 11(3): 549-560. DOI:10.1158/1535-7163.MCT-11-0594.
- [19] CHANG H R, NAM S, KOOK M C, et al. HNF4 α is a therapeutic target that links AMPK to WNT signalling in early-stage gastric cancer[J]. Gut, 2016, 65(1): 19-32. DOI:10.1136/gutjnl-2014-307918.
- [20] SONG Z, YUE W, WEI B, et al. Sonic hedgehog pathway is essential for maintenance of cancer stem-like cells in human gastric cancer[J/OL]. PLoS One, 2011, 6(3): e17687[2018-06-06]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3048871/>. DOI: 10.1371/journal.pone.0017687.
- [21] HAN G, GONG H J, WANG Y D, et al. AMPK/mTOR-mediated inhibition of survivin partly contributes to metformin-induced apoptosis in human gastric cancer cell[J]. Cancer Biol Ther, 2015, 16(1): 77-87. DOI:10.4161/15384047.2014.987021.
- [22] HIRSCH H A, ILIOPOULOS D, STRUHL K. Metformin inhibits the inflammatory response associated with cellular transformation and cancer stem cell growth[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2013, 110(3): 972-977. DOI:10.1073/pnas.1221055110.

[收稿日期] 2019-12-08

[修回日期] 2020-07-24

[本文编辑] 黄静怡