

miR-148a 调控 DNMT1 对子宫内膜癌增殖和凋亡的影响

孙璐¹, 吴苗苗¹, 李静芝¹, 闫洪超²

(1. 沭阳县中医院妇产科, 江苏 宿迁 223600; 2. 徐州医科大学附属医院妇产科, 江苏 徐州 221002)

摘要: **目的** 探讨微小 RNA-148a (miR-148a) 调控 DNMT1 对子宫内膜癌增殖和凋亡的影响。 **方法** 采用实时荧光定量聚合酶链反应 (qRT-PCR) 检测子宫内膜正常组织和癌组织中 miR-148a 的表达, 分析 miR-148a 与临床指标的相关性。通过脂质体 Lipofectamine 2000 介导 miR-148a mimics 转染至子宫内膜癌细胞 HEC-1B 中, qRT-PCR 检测转染效率, MTT 和流式细胞仪检测细胞增殖凋亡情况。Transwell 和 Western blot 检测细胞迁移侵袭能力。通过在线软件 Target Scan 确定 DNMT1 和 miR-148a 结合的靶位点, 荧光素酶报告基因验证 DNMT1 和 miR-148a 的靶向关系。 **结果** miR-148a 在子宫内膜癌组织和细胞中低表达; 过表达 miR-148a 抑制 HEC-1B 细胞增殖、迁移侵袭, 促进细胞凋亡; DNMT1 是 miR-148a 的靶基因; miR-148a 抑制小鼠体内肿瘤生长和 DNMT1 基因表达。 **结论** miR-148a 调控 DNMT1 抑制子宫内膜癌细胞增殖、迁移侵袭, 促进凋亡。

关键词: miR-148a; DNMT1; 子宫内膜癌; 增殖; 迁移侵袭; 凋亡

中图分类号: R711 **文献标志码:** A **文章编号:** 2096-3882(2019)12-0872-06

DOI: 10.3969/j.issn.2096-3882.2019.12.04

Effects of miR-148a on proliferation and apoptosis of endometrial carcinoma by targeting DNMT1

SUN Lu¹, WU Miaomiao¹, LI Jingzhi¹, YAN Hongchao²

(1. Department of Obstetrics and Gynecology, Shuyang Hospital of Traditional Chinese Medicine, Suqian, Jiangsu 223600, China; 2. Department of Obstetrics and Gynecology, the Affiliated Hospital of Xuzhou Medical University, Xuzhou, Jiangsu 221002)

Abstract: **Objective** To investigate the effect of miR-148a targeting DNMT1 on the proliferation and apoptosis of endometrial carcinoma. **Methods** The expression of miRNA-148a (miR-148a) in normal and cancerous endometrial tissues was detected by quantitative real time polymerase chain reaction (qRT-PCR) and the correlation between miR-148a and clinical indicators was analyzed. Endometrial cancer cells HEC-1B were transfected with miR-148a mimics *in vitro* by Lipofectamine 2000. The transfection efficiency was detected by qRT-PCR and proliferative activity and apoptotic percentage of cells were measured by MTT and flow cytometry. Transwell and Western blot were used to detect the ability of cell migration and invasion. Target sites of DNMT1 and miR-148a were determined by online software Target Scan, and the targeting relationship between DNMT1 and miR-148a was verified by luciferase reporter gene. **Results** Compared with normal tissues, the expression of miR-148a in endometrial carcinoma tissues was significantly decreased. Overexpression of miR-148a inhibited the proliferation, suppressed cell migration and invasion ability, and promoted cell apoptosis of HEC-1B cells. DNMT1 is the target gene of miR-148a. miR-148a inhibited tumor growth and DNMT1 gene expression in mice. **Conclusions** miR-148a regulates DNMT1 to inhibit the cell proliferation, migration and invasion ability promotes the percentage of cell apoptosis.

Key words: miR-148a; DNMT1; endometrial cancer; proliferation; apoptosis

子宫内膜癌是女性最常见的恶性肿瘤之一,近年来,其发病率呈上升趋势,且呈年轻化趋势^[1]。2016年,新诊断子宫内膜癌病例为120万例。此外,与2005年相比,预计2025年子宫内膜癌发病率

可能增加50%~100%^[2]。因此,探讨子宫内膜癌的发生发展机制,可为子宫内膜癌的诊断和治疗提供新的思路。微小RNAs(miRNAs)是一类非编码RNA,在子宫内膜癌等多种肿瘤的病理过程中发挥

基金项目:江苏省自然科学基金面上项目(BK20171182)

着重要作用^[3]。已有文献证明,miRNA-200a(miR-200a)和miR-200b促进子宫内膜癌细胞增殖^[4]。miR-148a作为癌基因发挥作用,诱导胃癌细胞增殖和侵袭^[5]。许多研究表明,miRNA通过下调靶基因的mRNA水平来调控基因表达,或者通过靶向3'-UTR的结合位点进行转录后抑制^[6]。过晓强等^[5]研究得出,miR-148a通过靶向DNMT1抑制胃癌细胞增殖,提高胃癌细胞凋亡率。然而,尽管miR-148a在多种癌症中的作用已被研究,但miR-148a在调节子宫内膜癌增殖和凋亡中的潜在机制尚未完全阐明。因此,本研究的目的是通过DNMT1探讨miR-148a与子宫内膜癌细胞增殖和凋亡的关系,并进一步探讨子宫内膜癌的发病机制。

1 材料与方法

1.1 实验材料 入选病例为2017年—2018年经沭阳县中医院妇产科切除且经病理证实的子宫内膜癌患者40例,年龄30~65岁,平均年龄(50.95±6.98)岁,所有患者手术前均未进行放疗或化疗。肿瘤的分期是根据国际妇产科联合会(FIGO)分期系统标准确定。另外选取同期因其他原因进行手术并通过病理切片证实的正常组织20例,其他原因包括肌瘤或子宫内膜异位症,患者年龄为30~60岁,平均年龄(52.4±7.2)岁。本研究通过沭阳县中医院医学伦理委员会的审查,且获得了批准同意,同时每位研究对象均签署了知情同意书。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养 子宫内膜癌细胞系KLE、RL95-2、Ishikawa、AN3CA、HEC-1B与HEK293T细胞购自ATCC(美国)。细胞均用含10%胎牛血清的DMEM培养液(HyClone公司),HEK-293T细胞用含10%胎牛血清的H-DMEM培养液(HyClone公司),在37℃、5% CO₂的恒温培养箱(MCO-15AC,日本SANYO公司)中进行常规培养,每2 d换液1次,待细胞生长至90%融合度,按照1:3比例传代。

1.2.2 细胞转染及分组 取对数生长期HEC-1B细胞,按6×10⁵个/孔接种于6孔板中,37℃、5% CO₂培养箱内过夜培养,直到60%的细胞融合。分别将miR-148a mimics、mimics-NC(上海吉玛制药有限公司)于DMEM培养液中,转染细胞分为3组:Mock组、mimics-NC组、miR-148a mimics组,每组3个样本。常规培养4 h后更换为新DMEM培养液,继续培养,收集细胞进行后续试验。

1.2.3 实时荧光定量聚合酶链反应检测 miR-

148a的表达 TRIzol试剂(Invitrogen公司)法提取各组细胞总RNA。取5 μl总RNA样品,用无RNA酶超纯水稀释20倍,紫外分光光度计测定RNA的浓度及260 nm和280 nm处的光密度(D)值, D_{260}/D_{280} 比值在1.9~2.0之间者,说明纯度较高,能够满足后续实验需要。在PCR扩增仪进行逆转录合成cDNA模版,用ABI7500定量PCR仪进行实时荧光定量聚合酶链反应(qRT-PCR)实验,反应条件为95℃预变性10 min,95℃变性10 s,60℃退火20 s,72℃延伸34 s,40个循环。得到的Ct值采用2^{-ΔΔCt}法进行分析,公式如下:ΔΔCt=[Ct(目的基因)-Ct(内参基因)]实验组-[Ct(目的基因)-Ct(内参基因)]对照组。U6为miR-148a内参基因;磷酸甘油醛脱氢酶(GAPDH)为DNMT1内参基因。Ct为反应的实时荧光强度达到设定的阈值时所经过的扩增循环数,此时扩增呈对数期增长。实验重复3次。

1.2.4 Western blot 检测检测细胞迁移侵袭能力 将裂解好的蛋白样品,采用BCA试剂盒(ThermoFisher公司)进行蛋白浓度的测定。取20 μg蛋白样品加入5×上样缓冲液,水中煮沸10 min,进行SDS-PAGE蛋白电泳。电泳结束后,用湿转电转移法将蛋白质转移到聚偏氟乙烯(PVDF)膜上,用5%脱脂牛奶-TBST封闭,室温摇床振荡2 h。封闭结束后,以洗膜液漂洗PVDF膜,分别加入兔抗人GAPDH(1:1 000,ab9485,Abcam公司)、DNMT1(1:1 000,ab19905,Abcam公司),4℃过夜摇床振荡孵育,TBST洗3次,每次10 min,加入辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔IgG(1:10 000,Sigma公司),室温振荡孵育1 h,TBST洗3次,每次10 min。进行化学发光显色,曝光、显影、定影,数据分析。内参为GAPDH。

1.2.5 MTT比色法实验 将转染后的各组细胞制成单细胞悬液,接种于96孔板中,每孔接种6×10³个细胞,每孔体积200 μl,重复6孔。37℃、5% CO₂培养箱培养24~72 h,每孔加MTT液(5 g/L,Sigma公司)20 μl;继续培养箱孵育4 h,终止培养,弃去培养液。每孔再加入DMSO,剂量为150 μl,轻匀摇动10 min,促进结晶溶解。测定0、24、48、72 h各孔D值;将D值设置为纵坐标,将间隔时间设置为横坐标后绘制MTT曲线图。实验重复3次。

1.2.6 流式细胞仪检测细胞凋亡 取转染后48 h的各组细胞,1 000 r/min离心5 min,收集细胞,用PBS洗涤细胞2次,离心收集(1~5)×10⁵个细胞;先加入500 μl的结合缓冲液悬浮细胞,再加入5 μl

Annexin V – FITC, 混匀, 最后加入 5 μl 碘化丙啶 (PI), 混匀, 在室温、避光条件下反应 5 ~ 15 min。流式细胞仪 (BD Bioscience 公司) 检测, 分析细胞凋亡比例。

1.2.7 Transwell 实验检测细胞迁移侵袭能力 取转染后培养 48 h 的细胞制备细胞悬液, 接种 Transwell 小室上室。在 Transwell 小室接种细胞前 1 d, 在小室底部膜的上室面铺基质胶, 按照 Transwell 小室说明, 将侵袭小室下室加入含 10% 胎牛血清 (FBS) 的 DMEM 培养基, 将侵袭小室上室加入各组细胞悬液 (迁移不加基质胶)。将侵袭小室置于 37℃、5% CO₂ 培养箱培养 48 h, 显微镜下观察侵袭小室下室, 待少量细胞穿出后终止实验。用棉签擦去基质胶和上室内细胞, 4% 多聚甲醛固定, 0.25% 考马斯亮蓝染色。倒置显微镜下 (Olympus Ckx53) 进行观察拍照, 任取 5 个视野进行细胞计数, 以其平均值表示侵袭细胞数, 进行统计学分析。

1.2.8 双荧光素酶报告基因实验 通过在线预测软件 Target Scan 确定 DNMT1 和 miR – 148a 结合的靶位点, 合成 DNMT1 和 miR – 148a 结合位点的突变序列和野生序列。将 DNMT1 – Mut 和 DNMT1 – Wt 序列片段克隆并与 PsiCHECK – 2 载体 (Promega 公司) 结合, miR – 148a mimics、miR – 148a 阴性对照物 (上海吉玛制药技术有限公司) 分别共转染 HEK – 293T 细胞, 转染 48 h 后, 使用双荧光素酶试剂盒 (Promega 公司) 检测各组细胞的荧光活性强度。

1.2.9 裸鼠成瘤实验 动物实验程序均按照美国国立卫生研究院出版的《实验动物护理和使用指南》进行。雄性裸鼠 (BALB/c, 4 周龄) 购自中国科学院上海实验动物中心。将小鼠随机分成 2 组, 每组 5 只小鼠取对数生长期的 mimics – NC 组、miR – 148a mimics 组的子宫内膜癌细胞 HEC – 1B (1 × 10⁷ 个/裸鼠), 0.2 ml 注射到裸鼠的左侧腋下皮内, 注射后每 7 d 用游标卡尺测移植瘤最长径 (L) 和最短径 (W), 计算肿瘤体积: $V = L \times W^2 / 2$, 绘制肿瘤生长曲线。4 周实验结束, 完整剥离肿瘤, 测量重量。

1.3 统计学处理 用 SPSS 17.0 和 GraphPad Prism 5.01 统计软件分析数据, 所有计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 2 组间的比较采用 *t* 检验, 多组间比较采用 one – way ANOVA 单因素方差分析, 两两比较采用 Tukey 多重对比检验。P < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 miR – 148a 在子宫内膜癌组织和正常组织中的表达 qRT – PCR 检测子宫内膜癌组织及正常组织中 miR – 148a 的表达, 结果显示, 子宫内膜癌组织 miR – 148a 表达量显著低于正常组织 (P < 0.01)。见表 1。

表 1 miR – 148a 在子宫内膜癌组织和正常组织中的表达

组别	n	miR – 148a 相对表达量
子宫内膜癌组织	40	0.60 ± 0.25 ^a
正常组织	20	1.0 ± 0.37

与正常组织比较: ^aP < 0.01

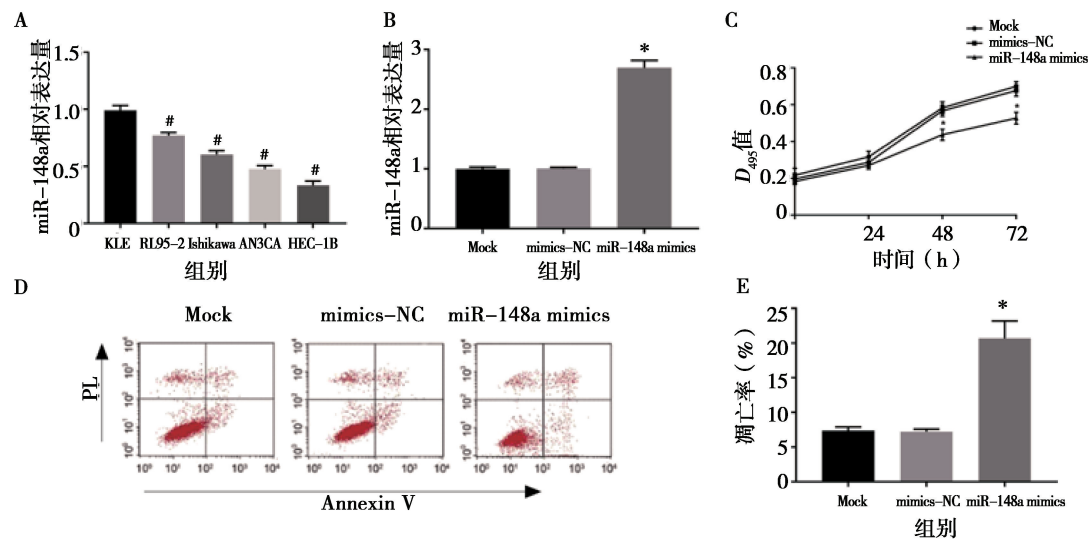
2.2 miR – 148a 表达量与临床病理特征之间的关系 结果显示, FIGO III/IV 期的 miR – 148a 表达量显著低于 I/II 期, 且 miR – 148a 表达量与癌组织浸润深度有明显的相关性。说明 miR – 148a 在子宫内膜癌组织中低表达且与临床指标密切相关。见表 2。

表 2 miR – 148a 表达量与临床病理特征之间的关系

临床病理特征	n	miR – 148a 相对表达量	P 值
FIGO 分期			< 0.01
I / II	25	0.70 ± 0.23	
III / IV	15	0.44 ± 0.20	
浸润深度			< 0.01
< 1/2	18	0.73 ± 0.27	
≥ 1/2	22	0.49 ± 0.19	

2.3 miR – 148a 抑制子宫内膜癌细胞增殖 在子宫内膜癌细胞系中, HEC – 1B 细胞中 miR – 148a 表达量最低 (P < 0.05) (图 1A), 因此选为后续的研究对象。转染 miR – 148a 至 HEC – 1B 细胞中, miR – 148a mimics 组 miR – 148a 的表达量显著高于 Mock 组和 mimics – NC 组 (P < 0.05) (图 1B), 说明转染成功。检测 miR – 148a 对子宫内膜癌细胞增殖的影响, MTT 结果表明 (图 1C), miR – 148a mimics 组 D₄₉₅ 值显著低于 Mock 组和 mimics – NC 组 (P < 0.05), Mock 组与 mimics – NC 组差异不显著 (P > 0.05)。流式细胞仪检测凋亡情况, 结果显示 (图 1D、E), 与 Mock 组和 mimics – NC 组相比, miR – 148a mimics 组凋亡率显著增加 (P < 0.05), 这说明

miR - 148a 抑制子宫内膜癌细胞增殖,促进凋亡。

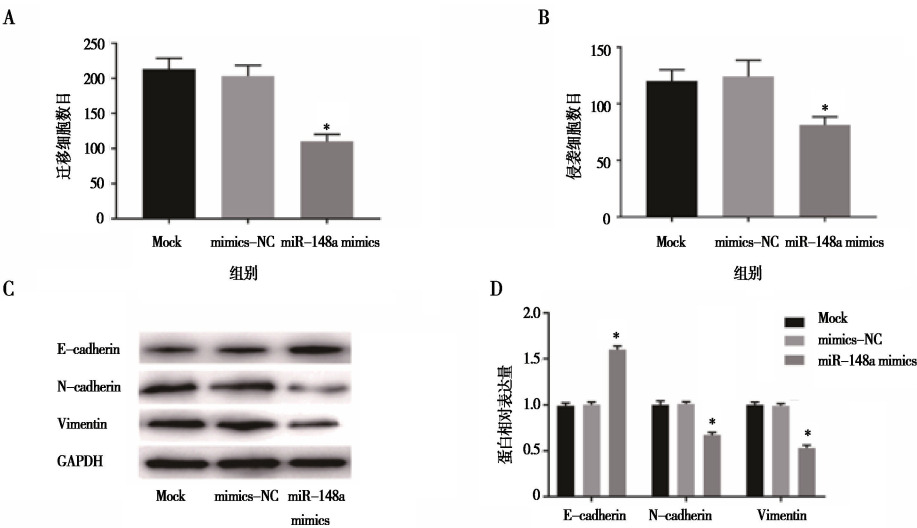


A. qRT - PCR 检测子宫内膜癌细胞系中 miR - 148a 的相对表达量;B. 转染效率检测;C. MTT 检测各组细胞增殖情况;D、E. 流式细胞仪检测各组细胞凋亡情况。与 KLE 组比较: # $P < 0.05$; 与 Mock 组和 mimics - NC 组比较: * $P < 0.05$

图1 miR - 148a 对子宫内膜癌细胞增殖凋亡的影响

2.4 miR - 148a 抑制子宫内膜癌细胞迁移侵袭
采用 Transwell 实验检测子宫内膜癌细胞系 HEC - 1B 的迁移侵袭能力,结果显示,miR - 148a mimics 组细胞迁移、侵袭细胞数目显著低于 Mock 组和 mimics - NC 组($P < 0.05$,图 2A、B)。采用 Western blot 检测上皮钙黏素(E - cadherin),神经钙黏素(N

- cadherin)和波形蛋白(Vimentin)表达,与 Mock 组和 mimics - NC 组比较,miR - 148a mimics 组 E - cadherin 升高, N - cadherin 和 Vimentin 表达降低,差异有统计学意义($P < 0.05$,图 2C、D)说明 miR - 148a 抑制子宫内膜癌细胞的迁移侵袭能力。

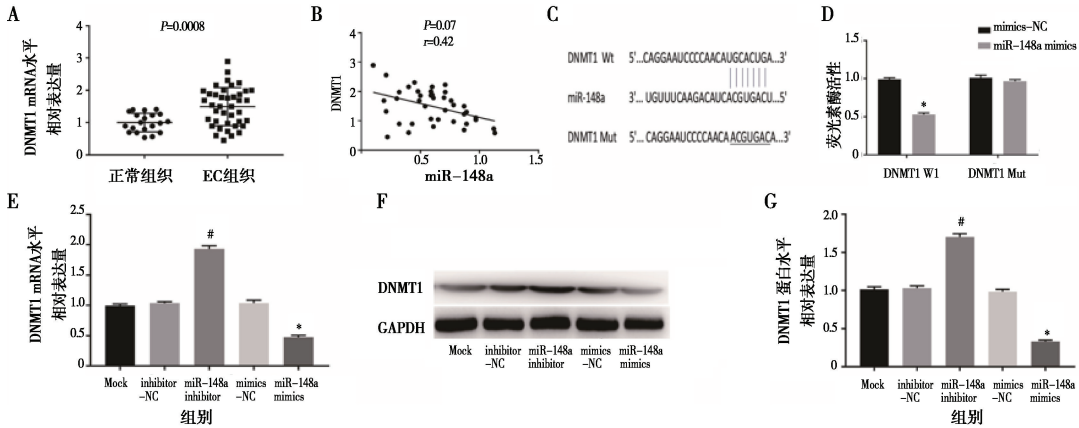


A. Transwell 迁移实验;B. Transwell 侵袭实验;C、D. Western blot 检测 E - cadherin、N - cadherin 和 Vimentin 表达。与 Mock 和 mimics - NC 组比较: * $P < 0.05$

图2 miR - 148a 对子宫内膜癌细胞迁移侵袭的影响

2.5 miR-148a 调控 DNMT1 基因表达 子宫内膜癌组织 DNMT1 高表达,miR-148a 与 DNMT1 表达水平呈负相关(图 3A、B)。通过 Targetscan 在线预测 miR-148a 与 DNMT1 的靶向关系,结果显示,miR-148a 与 DNMT1 的结合位点为 3'-UTR 区(图 3C)。荧光素酶报告基因检测显示(图 3D),miR-148a 与 DNMT1 野生型重组载体转染组荧光

素酶活性显著降低($P < 0.05$)。为了明确 miR-148a 是否逆转 DNMT1 的水平,我们检测了各组的 DNMT1 mRNA 和蛋白水平表达情况(图 3E、F、G),结果表明,miR-148a mimics 组 DNMT1 mRNA 和蛋白水平显著低于 mimics-NC 组($P < 0.05$),miR-148a inhibitor 组 DNMT1 mRNA 和蛋白水平显著高于 inhibitor-NC 组($P < 0.05$)。

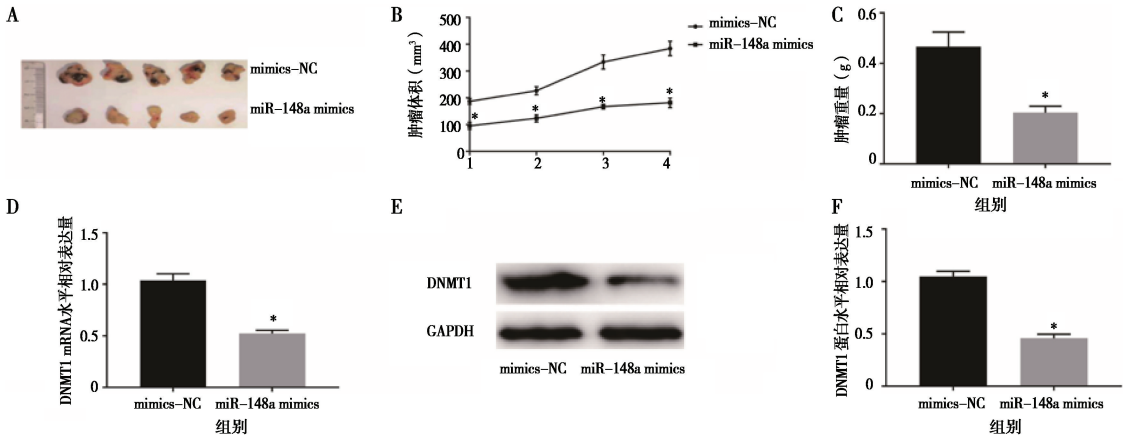


A. qRT-PCR 检测子宫内膜癌(EC)组织 DNMT1 表达;B. 相关性分析;C. Targetscan 预测 miR-148a 与 DNMT1 结合的靶位点;D. 双荧光素酶报告基因活性检测;E、F、G. qRT-PCR、Western blot 检测各组 DNMT1 mRNA 和蛋白表达情况。与 inhibitor-NC 组比较: # $P < 0.05$;与 mimics-NC 组比较: * $P < 0.05$

图3 miR-148a 调控 DNMT1 基因表达

2.6 miR-148a 抑制裸鼠移植瘤生长 为深入了解 miR-148a 在子宫内膜癌发生、发展的作用,我们采用体内实验进一步检测子宫内膜癌细胞对肿瘤生长的影响,结果显示,miR-148a 组肿瘤重量和体积明

显小于 mimics-NC 组($P < 0.05$)(图 4A、B、C),同时 qRT-PCR 和 Western blot 检测肿瘤中 DNMT1 表达,结果显示,miR-148a mimics 组 DNMT1 相对表达量显著低于 mimics-NC 组($P < 0.05$)(图 4D、E、F)。



A、B、C. miR-148a 对子宫内膜癌细胞 HEC-1B 裸鼠移植瘤生长体积、肿瘤的影响;D. qRT-PCR 检测肿瘤中 DNMT1 mRNA 的表达;E、F. Western blot 检测肿瘤中 DNMT1 蛋白表达。与 mimics-NC 组比较: * $P < 0.05$

图4 miR-148a 抑制裸鼠移植瘤生长

3 讨 论

子宫内膜癌对女性群体是一个巨大的潜在威胁,子宫内膜癌的死亡率在过去 20 年中也不断上升^[7]。因此,研究子宫内膜癌发展过程中的关键致癌基因和抑癌因子,寻找有效治疗的方法势在必行。miR-148a 是 miR-148/152 家族成员之一,参与细胞增殖、凋亡肿瘤细胞的增殖迁移。已有文献报道,miR-148a 在胃癌、膀胱癌、喉癌、结直肠癌、食管癌和胰腺癌等多种癌症中都存在异常表达下调^[8-12]。DNMT1 在肿瘤抑制基因的表现遗传沉默中起着关键作用。多项研究表明 DNMT1 是 miR-148a 介导肿瘤进展的靶基因。Wu 等^[10]报道,由于 LncRNA H19 在喉癌中表达上调,H19 的下调可通过上调 miR-148a-3p 的表达以及随后 DNMT1 水平的下调抑制细胞的侵袭、迁移和增殖。Lombard 等^[13]也进行了 miR-148a 与 DNMT1 在膀胱癌中的关系的研究。但是目前还没有关于 miR-148a 与 DNMT1 在子宫内膜癌中的关系的研究。

本研究发现 miR-148a 在子宫内膜癌组织和细胞中均呈现低表达。此外,我们通过对 miR-148a 表达及其临床病理因素的分析,发现 miR-148a 在子宫内膜癌进展过程中可能存在负相关关系。同时 DNMT1 mRNA 和蛋白表达水平高于正常组织,这也提示到 miR-148a 调控 DNMT1 可能参与子宫内膜癌的发生发展。为了进一步研究 miR-148a 调控 DNMT1 在子宫内膜癌的作用机制,我们分别进行了体外和体内实验,结果表明,miR-148a 抑制子宫内膜癌细胞增殖及迁移侵袭,同样也抑制小鼠体内肿瘤的生长。因此,miR-148a 可以作为子宫内膜癌诊断和治疗的新研究靶点。

参考文献:

[1] Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012[J]. Int J Cancer, 2015, 136(5):E359-E386. DOI: 10.1002/ijc.29210.

[2] Lindemann K, Eskild A, Vatten LJ, et al. Endometrial cancer incidence trends in Norway during 1953-2007 and predictions for

2008-2027[J]. Int J Cancer, 2010, 127(11):2661-2668. DOI: 10.1002/ijc.25267.

[3] Blenkiron C, Miska EA. MiRNAs in cancer: approaches, aetiology, diagnostics and therapy[J]. Hum Mol Genet, 2007, 16(Spec No 1):R106-R113. DOI: 10.1093/hmg/ddm056.

[4] Wu Q, Lu RL, Li JX, et al. MiR-200a and miR-200b target PTEN to regulate the endometrial cancer cell growth *in vitro*[J]. Asian Pac J Trop Med, 2017(5):474-477. DOI: 10.1016/j.apjtm.2017.05.007.

[5] 过晓强, 邓凯元, 夏加增, 等. 胃癌中 miR-148a 通过 DNMT1 调控 E-cadherin 的表达[J]. 南京医科大学学报(自然科学版), 2015, 35(4):470-474. DOI: 10.7655/NYDX-BNS20150406.

[6] Jiang XY, Li HC. MiR-1180-5p regulates apoptosis of Wilms' tumor by targeting p73[J]. Onco Targets Ther, 2018, 11:823-831. DOI: 10.2147/OTT.S148684.

[7] Amant F, Moerman P, Neven P, et al. Endometrial cancer[J]. Lancet, 2005, 366(9484):491-505. DOI:10.1038/npg.els.0006108.

[8] Dong YJ, Yu J, Ng SS. MicroRNA dysregulation as a prognostic biomarker in colorectal cancer[J/OL]. Cancer Manag Res, 2014, 6:405-422. DOI:10.2147/CMAR.S35164.

[9] Wang X, Liang Z, Xu X, et al. MiR-148a-3p represses proliferation and EMT by establishing regulatory circuits between ERBB3/AKT2/c-myc and DNMT1 in bladder cancer[J/OL]. Cell Death Dis, 2016, 7(12):e2503. DOI:10.1038/cddis.2016.373.

[10] Wu TY, Qu LM, He GQ, et al. Regulation of laryngeal squamous cell cancer progression by the lncRNA H19/miR-148a-3p/DNMT1 axis[J]. Oncotarget, 2016, 7(10):11553-11566. DOI: 10.18632/oncotarget.7270

[11] Lindner K, Eichelmann AK, Matuszcak C, et al. Complex epigenetic regulation of chemotherapy resistance and biology in esophageal squamous cell carcinoma via MicroRNAs[J/OL]. Int J Mol Sci, 2018, 19(2):E499. DOI: 10.3390/ijms19020499.

[12] Zhan Q, Fang Y, Deng XX, et al. The interplay between miR-148a and DNMT1 might be exploited for pancreatic cancer therapy[J]. Cancer Invest, 2015, 33(7):267-275. DOI: 10.3109/07357907.2015.1025794.

[13] Lombard AP, Mooso BA, Libertini SJ, et al. MiR-148a dependent apoptosis of bladder cancer cells is mediated in part by the epigenetic modifier DNMT1[J]. Mol Carcinog, 2016, 55(5):757-767. DOI: 10.1002/mc.22319.

收稿日期:2019-07-02 修回日期:2019-12-04
本文编辑:吴进