

• 论 著 •

KCTD11 对宫颈癌 HeLa 细胞增殖的影响及分子机制

张 激¹, 谭兴民^{2△}

四川省中西医结合医院:1. 肿瘤科;2. 妇科, 四川成都 610041

摘 要:**目的** 探讨含钾通道四聚结构域蛋白 11(KCTD11)对宫颈癌 HeLa 细胞增殖的影响及分子机制。**方法** 利用数据库比较 KCTD11 在宫颈癌组织及正常组织中的表达,并分析 KCTD11 表达与宫颈癌级别的关系。利用短发夹 RNA 载体构建技术,敲低 KCTD11 的表达,并利用 MTT 试验、流式细胞术检测 KCTD11 敲低对 HeLa 细胞增殖的影响。采用实时荧光定量 PCR(RT-qPCR)和 Western blot 检测下调 KCTD11 对细胞周期蛋白 mRNA 及蛋白水平的影响。同时,利用染色质免疫沉淀技术(ChIP)对其分子机制进行分析。**结果** KCTD11 在宫颈癌组织中的表达水平显著高于其在正常组织中的表达水平($P < 0.05$)。生长曲线及细胞周期分析结果表明,敲低 KCTD11 后,细胞周期阻滞于 G0/G1 期($P < 0.05$),细胞增殖速率降低($P < 0.001$)。并导致细胞周期相关蛋白(Myc、CDK2、CDK4、CDK6、CCND3 及 CCNE2)的 mRNA 及蛋白水平均下调($P < 0.001$)。数据库分析结果表明,多个细胞周期蛋白的表达与 KCTD11 的表达呈正相关。而 ChIP 分析结果表明,KCTD11 能够结合到原癌基因 Myc 启动子上。**结论** KCTD11 能够通过转录激活原癌基因 Myc 的表达,上调细胞周期相关蛋白的表达,从而促进宫颈癌细胞的增殖。

关键词: 含钾通道四聚结构域蛋白 11; 宫颈癌; 细胞增殖; Myc

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2022.06.022

中图法分类号:R737.34

文章编号:1673-4130(2022)06-0739-06

文献标志码:A

Influence and molecular mechanism of KCTD11 on the proliferation of cervical cancer cell HeLa

ZHANG Ji¹, TAN Xingmin^{2△}

1. Department of Oncology; 2. Department of Gynaecology, Sichuan Provincial Hospital of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Chengdu, Sichuan 610041, China

Abstract:**Objective** To investigate the effect and mechanisms of potassium channel tetramerization domain containing 11 (KCTD11) on the proliferation of cervical cancer cell HeLa. **Methods** The expression of KCTD11 in cervical cancer and normal tissue was compared using online database. The relationship between the expression of KCTD11 and the grade of cervical cancer was analyzed using online database. The expression of KCTD11 was knocked down by short-hairpin RNA (shRNA), the effect of KCTD11 knockdown on the proliferation of HeLa cells was detected by flow cytometry and MTT assay. RT-qPCR and Western blot were used to detect the effect of down-regulation of KCTD11 on mRNA and protein expression of cell cycle-related proteins. In addition, chromatin immunoprecipitation assay (ChIP assay) was used to explore the molecular mechanism of KCTD11 effect on cervical cancer cell proliferation. **Results** The expression of KCTD11 in cervical cancer was significantly higher than that in normal tissues, and the expression level increased significantly with the increase of cervical cancer grade. The results of MTT assay and cell cycle analysis showed that the cell cycle was arrested in G0/G1 phase after KCTD11 knocked down ($P < 0.05$), and cell proliferation rate was significantly reduced ($P < 0.001$). The results of database analysis showed that the expressions of cell cycle-related proteins (Myc, CDK2, CDK4, CDK6, CCND3 and CCNE2) were positively correlated with the expression of KCTD11. In addition, the mRNA and protein levels of cell cycle-related proteins (Myc, CDK2, CDK4, CDK6, CCND3 and CCNE2) were significantly down-regulated with KCTD11 down-regulation ($P < 0.001$). The results of ChIP assay showed that KCTD11 could bind on Myc promoter. **Conclusion** KCTD11 upregulates the expression of cell cycle-related proteins and promotes cell proliferation of cervical cancer cells

作者简介:张激,男,主治医师,主要从事肿瘤内科研究。△ **通信作者,** E-mail:39894249@qq.com。

本文引用格式:张激,谭兴民. KCTD11 对宫颈癌 HeLa 细胞增殖的影响及分子机制[J]. 国际检验医学杂志, 2022, 43(6): 739-744.

by binding on Myc promoter and activating Myc expression.

Key words: potassium channel tetramerization domain containing 11; cervical cancer; cell proliferation; Myc

宫颈癌是最常见的妇科恶性肿瘤之一,其发病率及病死率在女性恶性肿瘤中均高居第四位,仅 2020 年全球新增宫颈癌患者 60 余万例,新增死亡患者 30 余万例,且发病呈现年轻化趋势^[1]。研究表明人乳头瘤病毒(HPV)的感染与多数宫颈癌病例的发生密切相关,但环境因素及基因突变均可能诱导宫颈癌的发生和发展^[2-3]。近年来,基因异常表达与宫颈癌发生的关系正在成为临床关注和研究的热点,探讨具有价值的宫颈癌治疗靶点,对于临床治疗,提升女性健康具有十分重要的意义。

含钾通道四聚结构域蛋白 11(KCTD11)能够参与多种细胞生理活动,如细胞转移及凋亡等^[4-5]。研究表明,KCTD11 的表达与前列腺癌、肝癌及神经管细胞瘤的发生密切相关^[6-7],但其在宫颈癌中的作用及机制尚不明确。本研究分析了 KCTD11 在宫颈癌中的表达情况,探讨 KCTD11 对宫颈癌细胞增殖的影响及机制,旨在为宫颈癌的基因治疗提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料 宫颈癌 HeLa 细胞与人胚肾细胞系 HEK293FT 细胞购自中国医学科学院。DMEM 培养基、胎牛血清、青霉素/链霉素、胰蛋白酶购自美国 Gibco 公司。细胞总 RNA 提取试剂 Trizol、反转录试剂盒及定量试剂购自日本 Takara 公司。MG132 购自 MCE 公司。KCTD11 抗体及 Tubulin 抗体购自北京博奥森公司,Flag、Myc、CDK2、CDK4、CDK6、CCND3 及 CCNE2 抗体购自美国 CST 公司。Myc、CDK2、CDK4、CDK6、CCND3、CCNE2、KCTD11 及 GAPDH 定量引物购自华大基因。慢病毒包装质粒 pLP1、pLP2 及 VSVG,染色质免疫沉淀技术(ChIP)

检测试剂盒购自赛默飞生命科学公司。RIPA 裂解液、蛋白酶体抑制剂 PMSF 等常规生化试剂购自上海生工公司。

1.2 方法

1.2.1 MTT 测定 取生长状态良好的细胞,经过胰酶消化后添加培养基重新成悬,并利用细胞计数板进行计数处理后,将细胞加入 96 孔板,每孔 1 000 个细胞。放置培养箱中 24 h 后,每孔添加 MTT 溶液 25 μ L,培养 2 h 后,移除培养基,每孔添加 200 μ L DM-SO,水平摇床孵育 10 min 后,于 560 nm 波长条件下测定各组细胞吸光度(A_{560}),共测定 7 d,绘制成生长曲线。

1.2.2 Western blot 检测蛋白表达 取所需测定细胞,经过胰酶消化,磷酸盐缓冲液(PBS)清洗后,收集细胞沉淀,并添加适量的含蛋白酶体抑制剂的 RIPA 裂解液,冰上裂解 30 min 后,离心收集上清液。利用 BCA 试剂盒测定各组蛋白浓度,根据浓度计算上样量,每组上样 50 μ g 蛋白。各组蛋白经高温变性后,于 10% PAGE 胶中进行电泳,并将蛋白转印到 PVDF 膜上。使用 5%脱脂牛奶室温封闭 2 h 后,孵育一抗(4 $^{\circ}$ C 过夜),次日回收一抗,TBST 清洗后,室温孵育二抗 2 h。使用 TBST 清洗,利用化学发光试剂检测相关蛋白信号。

1.2.3 实时荧光定量 PCR(RT-qPCR) 经胰酶消化,PBS 清洗后的细胞沉淀,依据 RNA 提取试剂盒步骤提取总 RNA(默克生物,货号:12183018A),经过质量检测及浓度测定后,将其反转录为 cDNA。后采用 RT-qPCR 进行检测,每组 3 个复孔。引物序列见表 1。

表 1 定量引物序列

引物	上游引物序列	下游引物序列
KCTD11	CGGGGACCCCATCACTATGA	TCAGAGTCGGTGCAGAAAAGG
Myc	GGATTCCCGCCTCAGAATAAC	GTGGGTGTGGGTTGTTCAGG
CDK2	TGTTTAACGACTTTGGACCGC	CCATCTCCTCTATGACTGACAGC
CDK4	GGGGACCTAGAGCAACTTACT	CAGCGCAGTCCTTCCAAAT
CDK6	GCTGACCAGCAGTACGAATG	GCACACATCAAACAACCTGACC
CCND3	TACCCGCCATCCATGATCG	AGGCAGTCCACTTCAGTGC
CCNE2	TCAAGACGAAGTAGCCGTTTAC	TGACATCCTGGGTAGTTTTCCTC
GAPDH	TGTGGGCATCAATGGATTG	ACACCATGTATTCCGGGTCAAT

1.2.4 ChIP 分析 过表达融合 Flag 标签 KCTD11 蛋白的 HeLa 细胞经过 1% 甲醛溶液固定后,利用细胞刮刀收集细胞沉淀,并加入裂解液,于适合的超声条件下,将其染色质打断到 200~1 000 bp。离心取上清液,并加入 Flag 抗体或 IgG,4 ℃ 旋转过夜。次日,加入磁珠,并依照试验步骤,添加缓冲液进行清洗纯化。清洗纯化后的磁珠-抗体-染色质片段,经过剥离液处理后,利用核酸回收试剂盒进行纯化回收后,利用 Myc 启动子引物进行 RT-qPCR,并分析试验结果,具体试验步骤参照碧云天 ChIP 分析试剂盒,货号: P2078。

1.2.5 细胞周期检测 取各组细胞经过胰酶消化后,使用 PBS 清洗两次,收集细胞沉淀。使用 75% 乙醇重新成悬细胞,直至完全成悬成单个细胞,放置于 -20 ℃ 冰箱,固定 24 h。固定完成后,离心收集细胞沉淀,使用预冷 PBS 清洗 3 次,用 PBS 重新成悬,加核糖核酸酶(RNAase)37 ℃ 处理 30 min,加入 500 μL PI 常温避光染色 30 min,使用流式细胞仪分析各组细胞的细胞周期分布情况。

1.2.6 数据库分析 本研究使用 UALCAN 数据库(网址: <http://ualcan.path.uab.edu/index.html>)分析 KCTD11 在宫颈癌中的表达及与宫颈癌分级间的关系,首先选定“TCGA analysis”栏,于“Enter gene symbol”中输入“KCTD11”,在“TCGA dataset”中选定宫颈癌后,点击“Explore”即可得到分析结果。

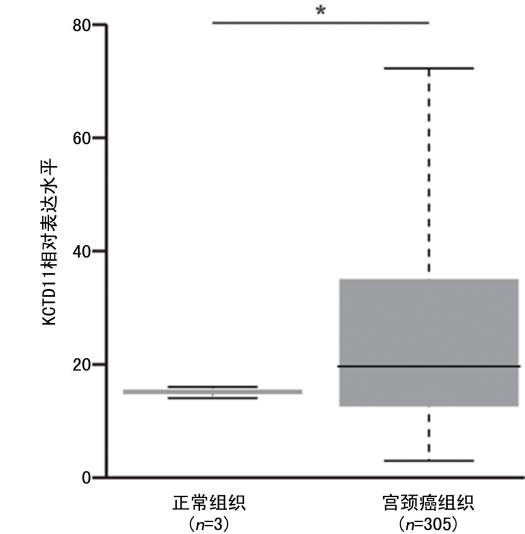
本研究使用 GEPIA 2 数据库(网址: <http://gepia2.cancer-pku.cn/#survival>)分析 KCTD11 与细胞周期蛋白表达相关性,选择“Expression analysis”中“Correlation analysis”,在 gene 栏中输入需要分析的两个基因名,肿瘤类型中选择宫颈癌,并点击“Plot”即可得到分析结果,根据数据库进行分组,分为正常组织($n=3$)和宫颈癌组织($n=305$)。

1.2.7 短发夹 RNA(shRNA)载体构建 取 shRNA 上游和下游各 10 μL,设置一个对照(shNeg 组)及两个试验组,即 shKCTD11-1 组与 shKCTD11-2 组,加入双蒸水 80 μL 于 1.5 mL 离心管中。另取烧杯,装适量沸水,将离心管放置烧杯内,使其自然退火降温。取退火 shRNA 5 μL,酶切后加入 PLKO.1 载体 1 μL,使用 T4 连接酶系统室温连接过夜后,转化涂板,挑取单克隆进行测序。收到测序结果后,与 shRNA 序列进行比对,选取 100% 匹配的菌株提取质粒,即得到构建好的 shRNA 载体。

1.3 统计学处理 所有数据均采用 SPSS20.0 和 Graphpad Prism 5.0 软件进行分析。正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较使用单因素方差分析。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

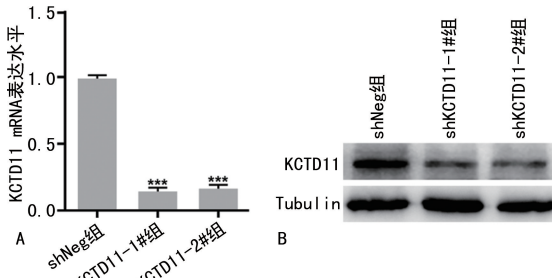
2 结 果

2.1 KCTD11 在宫颈癌中的表达 利用在线数据库(<http://ualcan.path.uab.edu/index.html>)比较 KCTD11 在宫颈癌组织和正常组织中的表达情况,结果表明 KCTD11 在宫颈癌组织中的表达水平显著高于其在正常组织中的表达水平($P < 0.05$),见图 1。



注: * $P < 0.05$ 。
图 1 KCTD11 在宫颈癌中的表达分析

2.2 敲低 KCTD11 对宫颈癌细胞增殖情况的影响 shKCTD11-1 组及 shKCTD11-2 组细胞中 KCTD11 的 mRNA 和蛋白表达水平显著低于 shNeg 组($P < 0.001$),见图 2。与 shNeg 组相比,shKCTD11-1 组及 shKCTD11-2 组细胞增殖能力显著降低($P < 0.001$),见图 3。同时下调 KCTD11,会导致细胞周期阻滞于 G0/G1 期($P < 0.05$),见图 3。



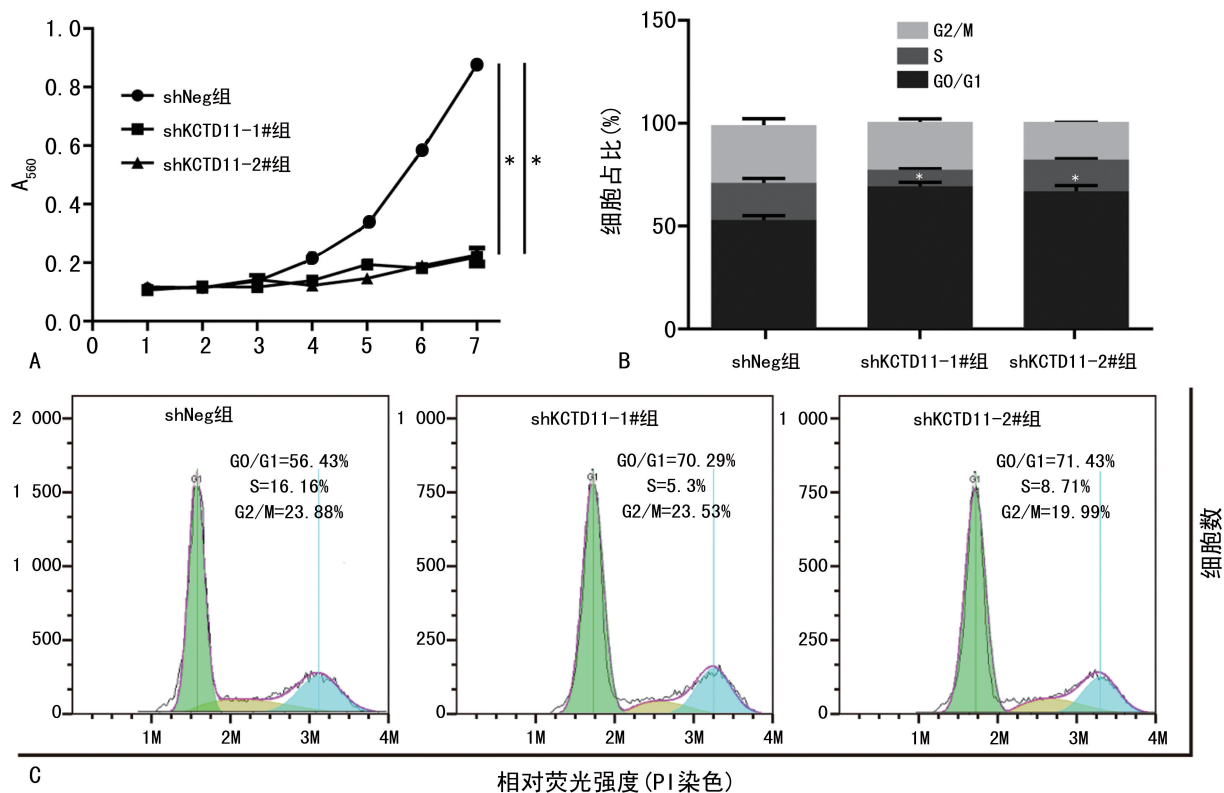
注:A 为 KCTD11 mRNA 在各组细胞中表达情况;B 为 KCTD11 蛋白在各组细胞中表达情况;与 shNeg 组比较,*** $P < 0.001$ 。

图 2 RT-qPCR 和 Western blot 检测各组细胞中 KCTD11 的表达

2.3 KCTD11 的表达与多种周期蛋白表达的关系 分析数据库数据(<http://gepia2.cancer-pku.cn/#index>)发现,KCTD11 的表达与原癌基因 Myc 及多种细胞周期蛋白(CDK2、CDK4、CDK6、CCND3 及 CCNE2)表达呈正相关,见图 4。

2.4 抑制 KCTD11 对细胞周期蛋白表达水平的影响

响 抑制 KCTD11 后, shKCTD11-1 # 组及 sh-KCTD11-2 # 组细胞中原癌基因 Myc 及多种细胞周期蛋白(CDK2、CDK4、CDK6、CCND3 及 CCNE2)的 mRNA 及蛋白表达水平显著低于 shNeg 组 ($P < 0.001$), 见图 5。



注: A 为各组细胞生长曲线; B 为细胞占比统计图; C 为流式细胞仪测定各组细胞周期分布情况; * $P < 0.05$ 。

图 3 KCTD11 对宫颈癌细胞增殖的影响

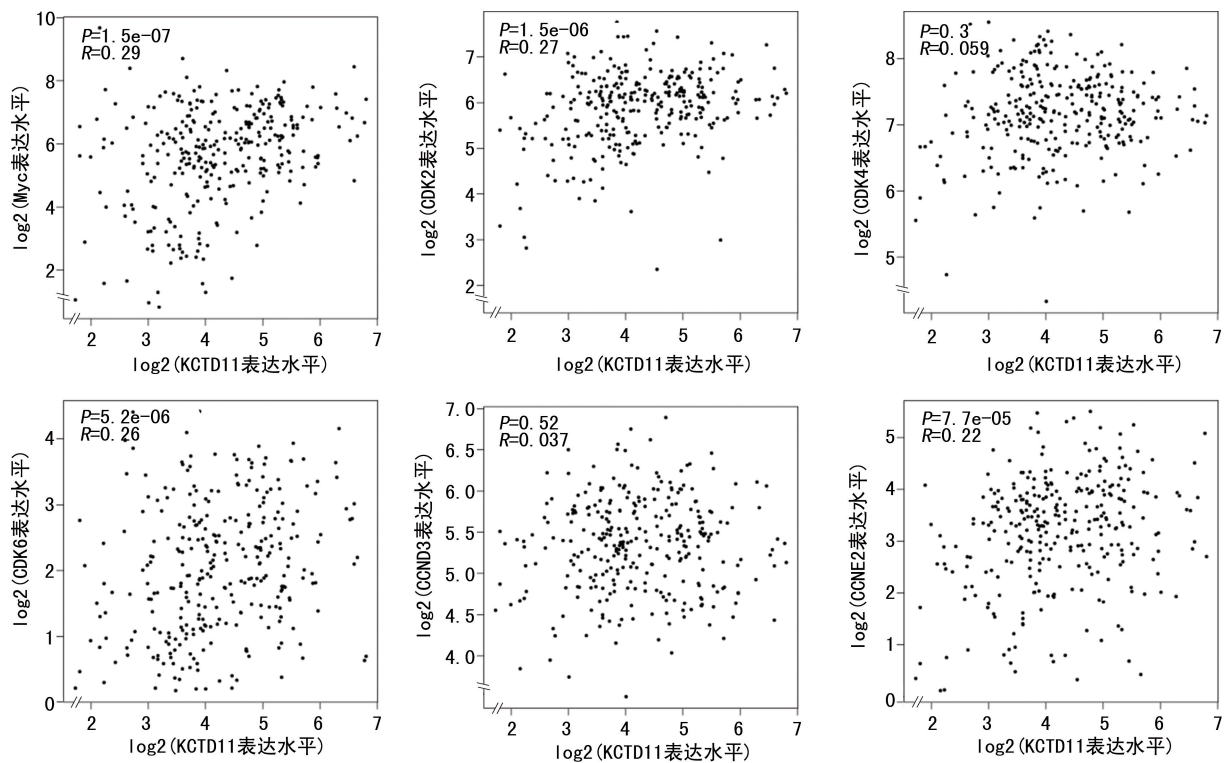
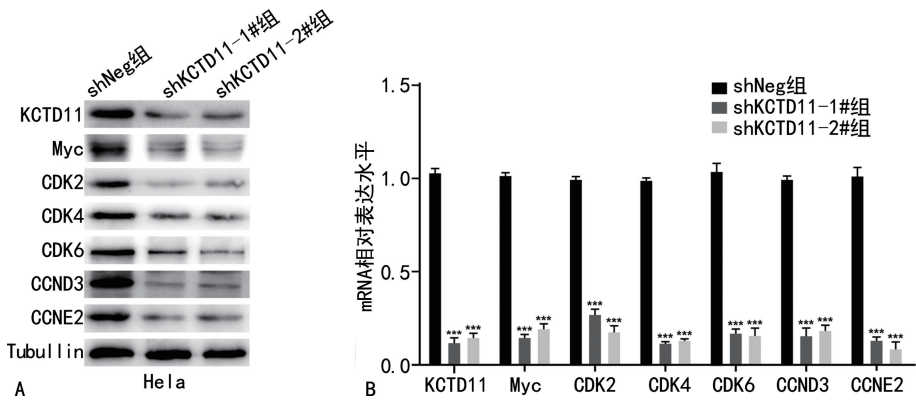


图 4 KCTD11 与 Myc、CDK2、CDK4、CDK6、CCND3 和 CCNE2 表达量的关系

2.5 KCTD11 转录激活 Myc 在宫颈癌细胞周过表 达融合 Flag 标签的 KCTD11 蛋白, 利用 Flag 抗体进

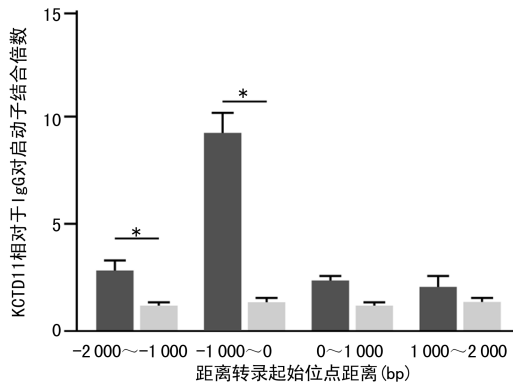
行 ChIP 分析。结果表明, KCTD11 能够结合到原癌基因 Myc 的启动子上, 从而激活 Myc 的表达, 见

图 6。



注: A 为抑制 KCTD11 后, 检测各基因的蛋白表达情况; B 为抑制 KCTD11 后, 检测各基因的 mRNA 表达情况; 与 shNeg 组比较, *** $P < 0.001$ 。

图 5 KCTD11 对细胞周期相关蛋白表达的影响



注: * $P < 0.05$ 。

图 6 KCTD11 对 Myc 表达的影响

3 讨 论

KCTD11 是 KCTD 家族成员之一。KCTD 蛋白家族在细胞内, 往往与 Cullin3 蛋白相互结合^[8], 参与基因的转录调控或泛素化调控过程, 与多种肿瘤的发生和发展密切相关^[9]。KCTD11 作为该家族蛋白成员之一, 早期研究主要着重于其与 Hedgehog 信号通路的关系, 在细胞和生物体发育过程中发挥着十分重要的作用^[10]。近年来, 有研究表明 KCTD11 的表达与肿瘤的发生密切相关, 如前列腺癌、肝癌及神经管细胞瘤等, 并发现其能直接激活 Hippo 信号通路^[6-7]。本研究由分析 KCTD11 在宫颈癌中的表达及其与宫颈癌级别的关系入手, 发现 KCTD11 在宫颈癌组织中表达显著升高, KCTD11 可能与宫颈癌的发展密切相关。为进一步探究 KCTD11 在宫颈癌中的作用, 本研究在宫颈癌细胞中对 KCTD11 进行了敲低处理, 结果表明敲低 KCTD11 能够阻滞宫颈癌细胞的细胞周期, 进而抑制宫颈癌细胞的增殖。分析数据库数据发现, KCTD11 的表达与包含原癌基因 Myc 在内的多种细胞周期蛋白呈正相关, 同时 Western blot 及

RT-qPCR 结果表明, 下调 KCTD11 会导致 Myc、CDK2、CDK4、CDK6、CCND3 及 CCNE2 等多个基因的 mRNA 及蛋白表达显著下调。

Myc 作为目前研究最为广泛的原癌基因之一, 参与肿瘤细胞的增殖、代谢重编程、迁移和侵袭等多种生理过程, 与多种肿瘤的发生和发展密切相关^[11-14]。作为转录因子, 其能够直接转录激活多种细胞周期蛋白的表达, 如 CDK2、CDK4、CDK6 及 CCND3 等^[15-17]。本研究发现, 敲低 KCTD11, 会抑制 Myc 及多个细胞周期蛋白的表达, 且数据库数据表明 KCTD11 的表达与 Myc 表达呈正相关。因此, 推测 KCTD11 可能通过调控 Myc 的表达, 进而调控细胞周期蛋白的表达。为验证这一假设, 本研究在 HeLa 细胞中过表达融合 Flag 标签的 KCTD11 蛋白, 并利用 Flag 标签抗体进行 ChIP 分析。结果表明 KCTD11 能够结合到 Myc 的启动子上, 从而激活 Myc 的表达。

综上所述, 本研究表明 KCTD11 能够通过转录激活 Myc 的表达, 上调细胞周期蛋白的表达, 从而促进宫颈癌的进展, 抑制 KCTD11 的表达可作为宫颈癌治疗的潜在靶点。

参考文献

[1] SUNG H, FERLAY J, SIEGEL R L, et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. CA Cancer J Clin, 2021, 71(3): 209-249.

[2] HU Z, MA D. The precision prevention and therapy of HPV-related cervical cancer: new concepts and clinical implications[J]. Cancer Med, 2018, 7(8): 5217-5236.

[3] TSIKOURAS P, ZERVOUDIS S, MANAV B, et al. Cervical cancer: screening, diagnosis and staging [J]. J BUON, 2016, 21(2): 320-325.

- [4] ZAZZERONI F, NICOSIA D, TESSITORE A, et al. KCTD11 tumor suppressor gene expression is reduced in prostate adenocarcinoma [J]. *Biomed Res Int*, 2014, 2014:380-398.
- [5] CORREALE S, PIRONE L, DI MARCOTULLIO L, et al. Molecular organization of the cullin E3 ligase adaptor KCTD11[J]. *Biochimie*, 2011, 93(4):715-724.
- [6] ZAWLIK I, ZAKRZEWSKA M, WITUSIK M, et al. KCTD11 expression in medulloblastoma is lower than in adult cerebellum and higher than in neural stem cells[J]. *Cancer Genet Cytogenet*, 2006, 170(5):24-28.
- [7] TONG R Q, YANG B, XIAO H, et al. KCTD11 inhibits growth and metastasis of hepatocellular carcinoma through activating Hippo signaling[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(23):37717-37729.
- [8] CANETTIERI G, DI MARCOTULLIO L, GRECO A, et al. Histone deacetylase and Cullin3-REN(KCTD11) ubiquitin ligase interplay regulates Hedgehog signalling through Gli acetylation[J]. *Nat Cell Biol*, 2010, 12(2):132-142.
- [9] TENG X, AOUACHERIA A, LIONNARD L, et al. KCTD: a new gene family involved in neurodevelopmental and neuropsychiatric disorders[J]. *CNS Neurosci Ther*, 2019, 25(7):887-902.
- [10] DI MARCOTULLIO L, FERRETTI E, DE SMAELE E, et al. REN(KCTD11) is a suppressor of Hedgehog signaling and is deleted in human medulloblastoma[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004, 101(12):10833-10838.
- [11] DANG C V. MYC on the path to cancer[J]. *Cell*, 2012, 149(1):22-35.
- [12] MASSO-VALLES D, BEAULIEU M E, SOUCEK L. MYC, MYCL and MYCN as therapeutic targets in lung cancer[J]. *Expert Opin Ther Targets*, 2020, 24(2):101-114.
- [13] PAGLIA S, SOLLAZZO M, DI GIACOM O, et al. Exploring MYC relevance to cancer biology from the perspective of cell competition[J]. *Semin Cancer Biol*, 2020, 63:49-59.
- [14] TROP-STEINBERG S, AZAR Y. Is Myc an important biomarker? Myc expression in immune disorders and cancer[J]. *Am J Med Sci*, 2018, 355(1):67-75.
- [15] YANG L Q, LEI Q, LI L, et al. Silencing or inhibition of H3K79 methyltransferase DOT1L induces cell cycle arrest by epigenetically modulating c-Myc expression in colorectal cancer[J]. *Clin Epigenetics*, 2019, 11(1):185-199.
- [16] GARCIA-GUTIERREZ L, BRETONES G, MOLINA E, et al. Myc stimulates cell cycle progression through the activation of Cdk1 and phosphorylation of p27 [J]. *Sci Rep*, 2019, 9(1):18685-18693.
- [17] BRETONES G, DELGADO M D, LEON J. Myc and cell cycle control[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2015, 1849(5):506-516.

(收稿日期:2021-09-12 修回日期:2021-11-28)

(上接第 738 页)

- [11] YANG P J, HSIEH M J, HUNG T W, et al. Effects of long noncoding RNA H19 polymorphisms on urothelial cell carcinoma development[J]. *Int J Environ Res Public Health*, 2019, 16(8):1322.
- [12] PEI J S, CHEN C C, CHANG W S, et al. Significant associations of lncRNA H19 genotypes with susceptibility to childhood leukemia in Taiwan[J]. *Pharmaceuticals*, 2021, 14(3):235.
- [13] AZAB N I, SALEH G E, MOHAMMED S A, et al. Genetic polymorphism of long noncoding RNA H19 in breast cancer in egyptian females [J]. *Benha J Applied Sci*, 2021, 6(1):285-289.
- [14] ZHENG Z, YAN Y, GUO Q, et al. Genetic Interaction of H19 and TGFBR1 Polymorphisms with risk of epilepsy in a Chinese population[J]. *Pharmgenomics Pers Med*, 2021, 14:77.
- [15] LI W, JIANG X, JIN X, et al. Significant association between long non-coding RNA H19 polymorphisms and cancer susceptibility: a PRISMA-compliant meta-analysis and bioinformatics prediction[J]. *Medicine*, 2020, 99(15):e19322.
- [16] HUANG J, YANG J, LI J, et al. Association of long non-coding RNA H19 polymorphisms with the susceptibility and clinical features of ischemic stroke in southern Chinese Han population[J]. *Metab Brain Dis*, 2019, 34(4):1011-1021.
- [17] HUANG M C, CHOU Y H, SHEN H P, et al. The clinicopathological characteristic associations of long non-coding RNA gene H19 polymorphisms with uterine cervical cancer[J]. *J Cancer*, 2019, 10(25):6191.
- [18] TAN T, LI J, WEN Y, et al. Association between lncRNA-H19 polymorphisms and hepatoblastoma risk in an ethnic Chinese population[J]. *J Cell Mol Med*, 2021, 25(2):742-750.
- [19] ZHOU Y, ZHANG Y. Inhibition of lncRNAH19 has the effect of anti-tumour and enhancing sensitivity to Gefitinib and Chemotherapy in Non-small-cell lung cancer in vivo[J]. *J Cell Mol Med*, 2020, 24(10):5811-5816.
- [20] REZAEI M, MOKHTARI M J, BAYAT M, et al. Long non-coding RNA H19 expression and functional polymorphism rs217727 are linked to increased ischemic stroke risk[J]. *BMC Neurol*, 2021, 21(1):54.

(收稿日期:2021-08-11 修回日期:2021-12-08)