

• 论 著 •

香烟烟雾提取物对人支气管上皮细胞中脂质代谢的影响研究*

张亚萍, 王礼兴, 颜芙蓉[△]

(福建医科大学附属第二医院中心实验室, 福建 泉州 362000)

[摘要] **目的** 基于液相色谱-质谱联用(LC-MS)技术研究香烟烟雾提取物(CSE)对人支气管上皮细胞(HBECs)中脂质代谢的影响。**方法** 体外建立 CSE 干预 HBECs 模型,以 5% CSE 干预的支气管上皮细胞为实验组,以无 CSE 干预的细胞为对照组,采用 LC-MS 技术定量检测 HBECs 内的脂质成分,数据经主成分分析及正交偏最小二乘法判别分析,从 728 个脂质(11 类脂质)中筛选出差异脂质。**结果** 与对照组比较,实验组的 HBECs 显示出 191 个差异表达脂质,有 185 个脂质上调,6 个脂质下调,其中增高数量比例最高的脂质为鞘脂途径脂质,增高倍数最大的脂质为甘油三酯。**结论** CSE 可导致 HBECs 的脂质代谢紊乱,尤其是鞘脂途径脂质的积累,可能与慢性阻塞性肺疾病进程相关。

[关键词] 脂质组学; 液相色谱-质谱联用; 香烟烟雾提取物; 人支气管上皮细胞; 鞘脂

DOI:10.3969/j.issn.1009-5519.2023.09.001 **中图法分类号:**Q591.5

文章编号:1009-5519(2023)09-1441-05

文献标识码:A

Effects of cigarette smoke extracts on lipid metabolism in human bronchial epithelial cells*

ZHANG Yaping, WANG Lixing, YAN Furong[△]

(Central Laboratory, the Second Affiliated Hospital of Fujian Medical University,
Quanzhou, Fujian 362000, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the effects of cigarette smoke extracts (CSE) on lipid metabolism in human bronchial epithelial cells (HBECs) based on liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS) technology. **Methods** A cell model of HBECs treated with CSE was established in vitro, with 5% CSE intervention bronchial epithelial cells as the experimental group and no CSE intervention cells as the control group. LC-MS was used to quantitatively detect lipids in HBECs. The data was analyzed by PCA analysis and OPLS-DA analysis, the differential lipids were screened out from 728 lipids (11 categories). **Results** Compared with the control group, CSE-induced HBECs showed 191 differentially expressed lipids, of which 185 lipids were up-regulated and six lipids were down-regulated. Among them, the lipids with the highest proportion of increased numbers were sphingolipid pathway lipids, and with the highest increase ratio was triglycerides. **Conclusion** CSE causing the lipid metabolism disorders in HBECs, especially the accumulation of lipids in the sphingolipid pathway, may be associated with the chronic obstructive pulmonary disease process.

[Key words] Lipidomics; Liquid chromatography-mass spectrometry; Cigarette smoke extract; Human bronchial epithelial cells; Sphingolipids

慢性阻塞性肺疾病(COPD)是一种以持续存在且不完全可逆的气流受限的常见慢性呼吸道疾病^[1],其患病率、死亡率高,影响到全世界数百万人。香烟烟雾是其最大的环境风险因素。脂质组学是一个新兴的研究领域,脂质代谢紊乱与糖尿病、心血管疾病、癌

症等重大疾病密切相关。最近有研究表明,脂质代谢紊乱与 COPD 的发展有关^[2-3],如鞘脂途径脂质在 COPD 吸烟者中高度表达,可能在 COPD 的发病机制中发挥作用^[4]。本研究采用 AB SCIEX QTRAP 4500 系统,基于液相色谱-质谱联用(LC-MS)技术,检测香

* 基金项目:福建省自然科学基金项目(2019J01171);福建省卫生健康委员会青年科研课题(2018-2-25);福建省泉州市科学技术局科技计划项目(2018Z122;2018N008S)。

作者简介:张亚萍(1984—),硕士研究生,副主任技师,主要从事细胞生物学代谢组学研究。 [△] 通信作者, E-mail: 857354425@qq.com。

烟烟雾提取物(CSE)对人支气管上皮细胞(HBECs)中脂质代谢的影响,旨在为研究脂质组学在 COPD 进程中的作用提供更多新思路。

1 材料与方法

1.1 一般材料 石狮牌香烟购自福建中烟工业有限责任公司,HBECs(HBE cell lines)购自中国武汉 Procell 生命科技有限公司,DMEM 培养基和胎牛血清购自美国 Gibco 公司,甲基叔丁基醚(MTBE)、甲醇、异丙醇和乙腈购自 Sigma 公司,内标物 Internal Standards Kit for Lipidizer Platform 和液相色谱-质谱仪 AB SCIEX QTRAP 4500 LC-MS/MS 系统购自美国 AB SCIEX 公司。

1.2 方法

1.2.1 CSE 的制备 参考文献[5]方法,负压吸引泵连接香烟烟嘴,将 2 支香烟点燃,匀速燃烧,每根控制在 5 min 内燃尽,利用负压吸引泵将香烟燃烧的烟雾溶于 20 mL 的细胞培养基中。将以上培养基的 pH 值调节至 7.4 后,使用 0.22 μm 过滤器对 CSE 进行无菌过滤。通过测量 320 nm 波长处的吸光度,对 CSE 进行标准化处理,此时的溶液被认定为 100% CSE。每次实验新鲜制备 CSE,并用培养基进行稀释处理。

1.2.2 细胞培养与 CSE 干预 HBECs 贴壁培养于含有 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基中,置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 和 5% CO_2 环境。100% CSE 以 DMEM 培养基进行稀释。实验组为 5% CSE 处理 24 h 的 HBECs,对照组为无 CSE 处理 24 h 的 HBECs。每组处理设 3 个重复。

1.2.3 细胞脂质样品制备 采用甲基叔丁基醚(MTBE)方法^[6]提取细胞内的脂质。实验组和对照组每组 3 个复孔,共 6 个样品。每个样品均收获 2×10^6 个细胞,−80 $^{\circ}\text{C}$ 冷冻 5 min,39 $^{\circ}\text{C}$ 解冻 5 min,重复 5 次。样品中加入 225 μL 甲醇,并加入内标物,涡旋振荡 10 s。样品中加入 750 μL MTBE,涡旋振荡 10 s,室温孵育 30 min。样品中加入 188 μL LC-MS 水后,样品涡旋振荡 20 s,室温孵育 10 min。离心(14 000 r/min, 15 min, 4 $^{\circ}\text{C}$)后收集上层相(800 μL),用氮气吹干仪蒸发。最后每个样品加入 120 μL 的混合物(异丙醇:乙腈:水的体积比为 300:650:50),回收脂质。

1.2.4 LC-MS 技术检测脂质成分 通过液相色谱-质谱仪(AB SCIEX QTRAP 4500 LC-MS/MS 系统)分析所有提取的脂质样品。Waters Acquity UPLC 色谱柱(100 mm $\times$ 2.1 mm $\times$ 1.7 μm)用作固定相。流动相 A 为含有 10 mmol/L 乙酸铵的 95%乙腈溶液,

流动相 B 为含有 10 mmol/L 乙酸铵的 50%乙腈溶液。流动相梯度洗脱程序:梯度从 0.1% 的 B 开始,在 10 min 内增加到 20% 的 B,然后在 10~11 min 内线性增加到 98% 的 B,98% 的 B 保持 2 min,13.1 min 回到初始条件的 0.1% B,16 min 最终停止分析,通过色谱柱的流速为 0.5 mL/min,柱温为 35 $^{\circ}\text{C}$ 。正电喷雾电离(ESI+)模式进样量为 1 μL ,负电喷雾电离(ESI−)模式进样量为 10 μL 。帘式气体(CUR)设置为 35 psi(1 psi=0.047 kPa),离子源气体 1(GS1)为 50 psi,离子源气体 2(GS2)为 60 psi,温度(TEM)设置为 500 $^{\circ}\text{C}$ 。ESI+和 ESI−模式下的离子喷雾电压分别设置为−5 500 V 和 5 500 V。去簇电位(DP)为 80 V,入口电位(EP)为 10 V,碰撞池出口电位(CXP)为 15 V。

1.3 数据处理 从 LC-MS 获得的原始数据导入 SIMCA 14.1 软件(Umetrics,Umeå,Sweden)。对照组和实验组数据(每组 3 个重复)经中心化(centering)与标度化(autoscaling)处理后,使用主成分分析(PCA)。PCA 能从总体上反映 2 组样本之间的总体代谢差异和组内样本之间的变异度大小。使用正交偏最小二乘法判别分析(OPLS-DA)数据,对 2 组样品中的差异脂质进行评估,并根据 OPLS-DA 模型中的 S-plot 及投影中的变量重要值(VIP)>1 筛选变量,并结合 *t* 检验的 *P* 值($P < 0.05$)和变化倍数(FC)寻找对照组和 CSE 组之间的差异脂质。R 语言软件(Rversion 4.1.3)用于绘制火山图与热图。GraphPad Prism 8.0 用于绘制各类脂质的变化比例图。

2 结果

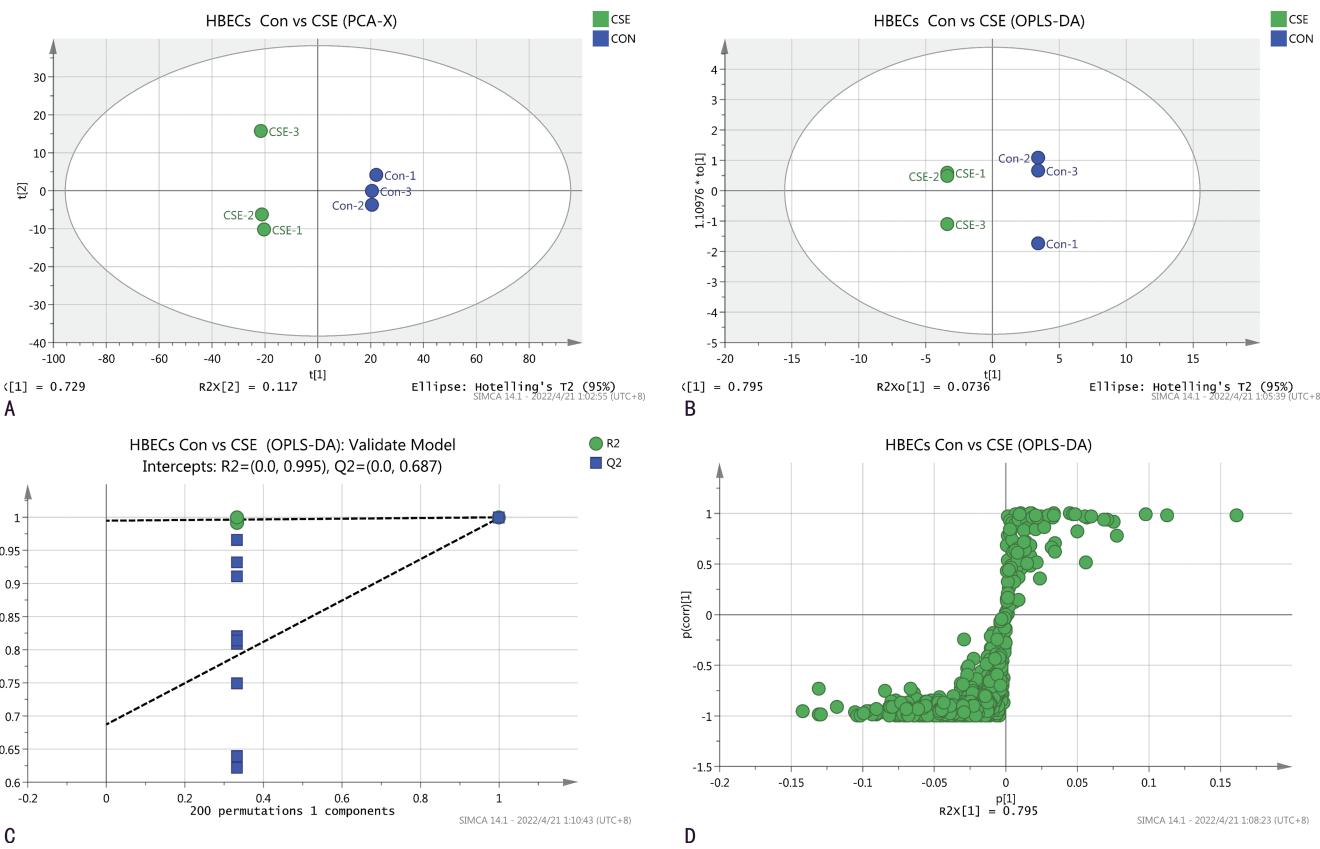
2.1 PCA 及 OPLS-DA 筛选 2 组间的差异脂质 AB SCIEX QTRAP 4500 LC-MS/MS 系统共定量检测了 11 类共 728 种脂质,包含 10 种神经酰胺(CER)、11 种二氢神经酰胺(DCER)、14 种葡萄糖神经酰胺(HCER)、6 种乳糖神经酰胺(LCER)、12 种鞘脂(SM)、20 种游离脂肪酸(FFA)、19 种胆固醇酯(CE)、16 种溶血磷脂酰胆碱(LPC)、76 种磷脂酰胆碱(PC)、132 种磷脂酰乙醇胺(PE)和 412 种甘油三酯(TAG)。

PCA 图($R^2X_{\text{cum}} = 0.999$, $Q^2_{\text{cum}} = 0.977$)在比较 2 组间的脂质时无交叉重叠,表明组间脂质代谢谱差异明显,见图 1A。

对照组与实验组比较的 OPLS-DA 模型,见图 1B,模型参数为 $R^2X_{\text{cum}} = 0.977$, $R^2Y_{\text{cum}} = 1$, $Q^2_{\text{cum}} = 0.999$,表明组间脂质代谢谱差异明显。为了确保模型的可靠性,采用置换检验(200 次置换)对

模型的质量进行验证,置换检验参数 $R^2Y_{cum} = (0.0, 0.995)$, $Q^2_{cum} = (0.0, 0.687)$,结果表明该模型是合适的,可以进行下一步的差异变量提取(图

1C)。通过 OPLS-DA 的 S-plot(图 1D)筛选出差异脂质。

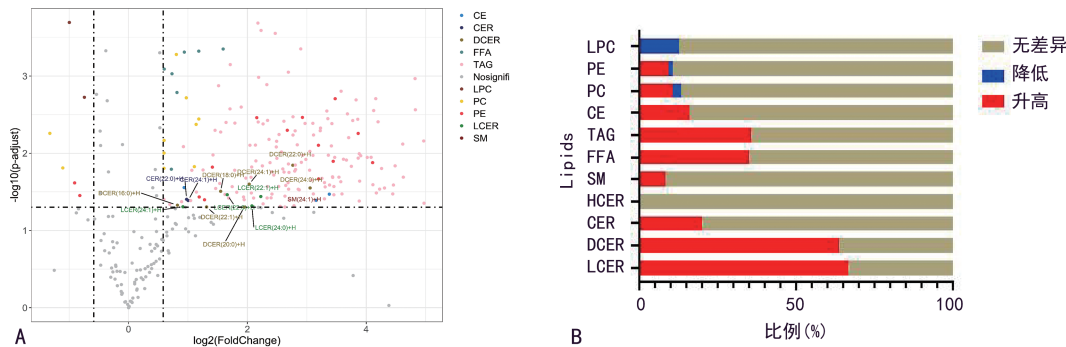


注:A. PCA 图;B. OPLS-DA 图;C. OPLS-DA 的置换检验;D. OPLS-DA 的 S-plot。

图 1 PCA 与 OPLS-DA 分析 CSE 对 HBECs 脂质代谢的影响

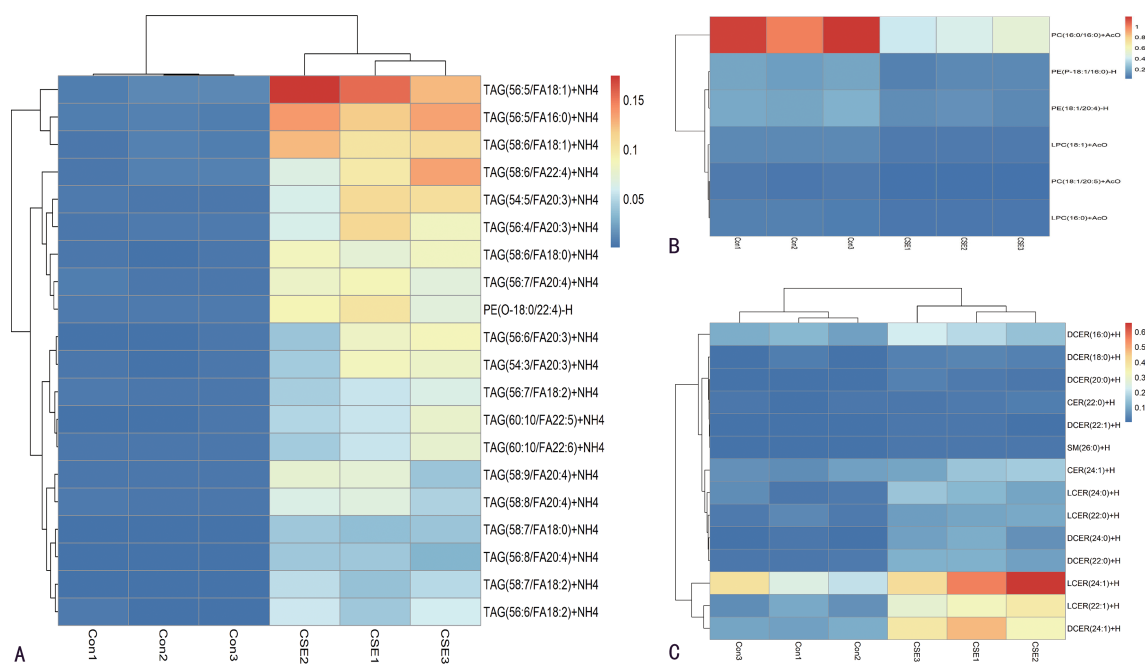
2.2 CSE 对 HBECs 内脂质代谢的影响 根据 $VIP > 1$, $P < 0.05$ 和 $\text{Fold Change} > 1.5$ 或小于 0.6 的标准筛选出 191 个差异性脂质。火山图 [$\log_2(\text{FC})$ 为横坐标, $-\log_{10}(P \text{ 值})$ 为纵坐标] 表示实验组与对照组之间差异表达的脂质(图 2A)。从脂质变化数量占比该种脂质的比例显示(图 2B),与对照组相比,66.7%(4/6)LCER、63.6%(7/11)DCER、20.0%(2/10)CER、8.3%(1/12)SM、35.0%(7/20)FFA、

35.7%(147/412)TAG、15.8%(3/19)CE、10.5%(8/76)PC 和 9.1%(12/132)PE 水平均升高,而只有 12.5%(2/16)LPC、2.6%(2/76)PC 和 1.5%(2/132)PE 6 个脂质显示水平下降(图 3B)。以上差异脂质中,升高倍数最大的前 20 个脂质大多数为 TAG(图 3A)。从脂质种类中变化比例分析,大多数的 SE 类脂质水平被 CSE 刺激提升(图 3C)。



注:A. 火山图,显示实验组与对照组的差异脂质种类;B. 11 类脂质的变化比例。

图 2 实验组与对照组的差异脂质种类



注:A. 差异性上调的 TOP20 脂质热图;B. 差异性下调的 6 个脂质热图;C. 鞘脂途径的差异脂质热图。

图 3 差异脂质热图

3 讨 论

脂质是机体内的一类重要生物分子,参与调节多种生命活动,脂质代谢的异常可能引发诸多疾病,对脂质组学研究具有重要的生物学意义和临床价值。目前,COPD 脂质组学的研究主要关注在患者外周血及气道分泌物中脂质代谢的变化,细胞特异性脂质代谢变化的研究较少,细胞功能在很大程度上受其代谢活动的影响。气道上皮细胞构成肺部的第一道防线,对防止微生物、烟雾等发挥着至关重要的作用,但这种防御屏障在 COPD 患者中功能受损^[7]。CSE 对 HBECs 中脂质代谢影响的研究有助于了解 HBECs 在香烟暴露环境下的脂质组学特征,本研究探索了 COPD 体外细胞模型的脂质组学,将为细胞代谢过程和功能提供机制线索,从而提高对 COPD 发展和进展的认识。

本研究结果发现,经 CSE 暴露后,HBECs 内的 TAG、CE、SE、甘油磷脂(PC、PE)等脂质水平发生了变化,绝大部分脂质水平呈升高趋势。其中,中性脂质中有 TAG 和 CE,TAG 是改变幅度最大的脂质,特别是 TAG(56:5/FA18:1)和 TAG(56:5/FA16:0)。TAG 被认为与心血管疾病、缺血性脑卒中和血脂异常等多种疾病有关,但在 COPD 中的作用还不明确。CE 是动物细胞中含量最丰富的脂类之一,与细胞内转运、细胞信号传导等多种细胞功能有关。有临床研究表明,在体重指数低于 25 kg/m² 的 COPD 亚组中,TAG 和胆固醇是疾病急性加重的危险因素^[8]。JIA 等^[9]研究证实,香烟暴露中胆固醇的氧甾醇代谢促进了 COPD 免疫发病过程中 B 细胞定位,从而引

发肺气肿。以上数据提示,香烟导致的 TAG 和 CE 水平升高可能影响了 COPD 中 HBECs 的功能。

FFA 作为各种生物活性脂质的前体,不同的脂肪酸参与了多种疾病的发展。FFA 氧化后可诱导内皮细胞发生炎症反应,促进其凋亡和活性氧簇生成,并改变脂筏的正常功能。JIANG 等^[10]的研究成果表明,香烟烟雾增强了气道上皮细胞的脂质生物合成能力,依托莫西对脂肪酸氧化途径的药理抑制作用减弱了香烟烟雾诱导的肺上皮细胞中活性氧积累和细胞死亡。COPD 的病理特征为持续的慢性炎症反应,香烟诱导的上皮细胞内脂肪酸水平升高,提示升高的脂肪酸可能参与了细胞的活性氧积累,进而导致氧化应激反应。

磷脂类成分可分为甘油磷脂和 SM 两大类,甘油磷脂是参与细胞信号转导的细胞膜的主要成分。PC 和 PE 是哺乳动物细胞中含量最丰富的甘油磷脂,参与维持细胞膜的流动性,在多种疾病的发展过程中表现出明显的变化。研究者在许多癌症中观察到 PC 和 PE 水平升高^[11]。在本研究结果中,10%左右 PC 和 PE 水平升高,特别是 PE(O-18:0/22:4)增幅显著,但有约 2%的 PC 和 PE 水平降低。磷脂代谢发生紊乱,其原因可能与细胞膜受损有关。肺表面活性物质是呼吸过程中必不可少的脂质-蛋白复合物,其中 90%的质量是脂质,能阻止空气中的颗粒和微生物到达远端呼吸道和肺泡。PC 和 LPC 参与了肺表面活性剂的稳态维持,肺表面活性剂成分改变与 COPD 相关^[12]。本研究的实验结果中,实验组 HBECs 内多种 LPC 代谢水平发生降低,与一项研究显示结果^[13]

(COPD 急性加重期患者的血清中 LPC 18 : 3、LPE 16 : 1 的表达水平较炎症亚型恢复期显著降低)吻合,提示 LPC 的降低可能影响肺表面活性剂的稳态。

SM 主要包括 CER、鞘磷脂和鞘糖脂,并根据细胞环境表现出广泛的生物学功能^[14]。鞘磷脂是以 SM 为骨架的化合物,在细胞膜结构、能量供应和信号转导方面发挥着重要作用,同时调控细胞生长、分化、迁移及凋亡过程,其代谢异常可导致炎症、肿瘤、免疫性疾病、心血管疾病等的发生。TELENGA 等^[4]研究证明,鞘磷脂与肺气肿密切相关。有研究表明,鞘糖脂与 COPD 恶化相关^[15]。CER 是鞘磷脂的一种成分,是所有鞘磷脂代谢的中心分子,可生成 DCER、LCER 和 SM。研究表明,CER 的积累参与了肺部疾病慢性炎症和肺气肿的发病^[16-17],CER 从头合成在肺部炎症中得到增强^[18],CSE 处理显著性诱导了 HBECs 中 LCER 的积累并启动异常自噬和细胞凋亡^[19]。本研究结果也证实了 CSE 可导致 HBECs 内的 SM 途径脂类(包括 LCER、DCER、CER 和 SM)的积累,特别是 DCER(24 : 1)和 LCER(22 : 1),提示 SM 紊乱可能参与了 COPD 的进程。

综上所述,本研究基于 LC-MS 技术对 CSE 诱导的 HBECs 进行脂质组学研究,分析细胞内 11 种脂质的变化,发现 CSE 导致了 HBECs 内脂质代谢紊乱,特别是 SM 途径中脂质的积累,为脂质组学在 COPD 的研究提供了基础资料与参考。

参考文献

- [1] HOGG J C, CHU F, UTOKAPARCH S, et al. The nature of small-airway obstruction in chronic obstructive pulmonary disease[J]. *New Eng J Med*, 2004, 350(26): 2645-2653.
- [2] LIU D, MEISTER M, ZHANG S, et al. Identification of lipid biomarker from serum in patients with chronic obstructive pulmonary disease[J]. *Respir Res*, 2020, 21(1): 242.
- [3] CHEN H, LI Z, DONG L, et al. Lipid metabolism in chronic obstructive pulmonary disease [J]. *Int J COPD*, 2019, 14: 1009-1018.
- [4] TELENGA E D, HOFFMANN R F, T'KINDT R, et al. Untargeted lipidomic analysis in chronic obstructive pulmonary disease. Uncovering sphingolipids[J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2014, 190(2): 155-164.
- [5] TATSUTA M, KAN-O K, ISHII Y, et al. Effects of cigarette smoke on barrier function and tight junction proteins in the bronchial epithelium; Protective role of cathelicidin LL-37 [J]. *Respir Res*, 2019, 20(1): 251.
- [6] MATYASH V, LIEBISCH G, KURZCHALIA T V, et al. Lipid extraction by methyl-tert-butyl ether for high-throughput lipidomics [J]. *J Lip Res*, 2008, 49(5): 1137-1146.
- [7] HEDSTRM U, HALLGREN O, BERG L, et al. Bronchial extracellular matrix from COPD patients induces altered gene expression in repopulated primary human bronchial epithelial cells [J]. *Sci Rep*, 2018, 22(1): 3502.
- [8] 李小平, 欧阳辉, 袁浩. 慢性阻塞性肺疾病与体质指数, 甘油三酯, 胆固醇的相关性研究 [J]. *国际呼吸杂志*, 2021, 41(7): 489-493.
- [9] JIA J, CONLON T M, SARKER R S, et al. Cholesterol metabolism promotes B-cell positioning during immune pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease [J]. *EMBO Mol Med*, 2018, 10(5): e8349.
- [10] JIANG Z, KNUDSEN N H, WANG G, et al. Genetic control of fatty acid β -oxidation in chronic obstructive pulmonary disease [J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2017, 56(6): 738-748.
- [11] WANG R, LI B, LAM S M, et al. Integration of lipidomics and metabolomics for in-depth understanding of cellular mechanism and disease progression [J]. *J Genet Genomics*, 2020, 47(2): 69-83.
- [12] WONG B H, DING M, CHUA G L, et al. The lipid transporter Mfsd2a maintains pulmonary surfactant homeostasis [J]. *J Biol Chem*, 2022, 298(3): 101709.
- [13] GAI X, GUO C, ZHANG L, et al. Serum glycerophospholipid profile in acute exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease [J]. *Front Physiol*, 2021, 12: 646010.
- [14] FUTERMAN A H, HANNUN Y A. The complex life of simple sphingolipids [J]. *EMBO Rep*, 2004, 5(8): 777-782.
- [15] BOWLER R P, JACOBSON S, CRUICKSHANK C, et al. Plasma sphingolipids associated with chronic obstructive pulmonary disease phenotypes [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2015, 191(3): 275-284. (下转第 1450 页)

- entgenol, 2018, 210(4):715-719.
- [11] KOHL K, HERZOG E, DICKNEITE G, et al. Evaluation of urinary biomarkers for early detection of acute kidney injury in a rat nephropathy model[J]. J Pharmacol Toxicol Methods, 2020, 105:106901.
- [12] KODAMA A, WATANABE H, TANAKA R, et al. A human serum albumin-thioredoxin fusion protein prevents experimental contrast-induced nephropathy[J]. Kidney Int, 2013, 83(3):446-454.
- [13] DUARTE C G, ZHANG J, ELLIS S. The SHR as a small animal model for radiocontrast renal failure. Relation of nephrotoxicity to animal's age, gender, strain, and dose of radiocontrast[J]. Ren Fail, 1997, 19(6):723-743.
- [14] SEO N, OH H, OH H J, et al. Quantitative analysis of microperfusion in contrast-induced nephropathy using contrast-enhanced ultrasound: An animal study[J]. Korean J Radiol, 2021, 22(5):801-810.
- [15] SHIBATA S, MONIWA N, KUNO A, et al. Involvement of necroptosis in contrast-induced nephropathy in a rat CKD model[J]. Clin Exp Nephrol, 2021, 25(7):708-717.
- [16] TEHRANI S, LAING C, YELLON D M, et al. Contrast-induced acute kidney injury following PCI[J]. Eur J Clin Investig, 2013, 43(5):483-490.
- [17] 刘颖, 杨继红, 施红, 等. 氧自由基在老年人造影剂肾病中作用的研究进展[J]. 中华老年医学杂志, 2021, 40(3):397-400.
- [18] LIU K, ZHOU L Y, LI D Y, et al. Corrigendum to "A novel rat model of contrast-induced nephropathy based on dehydration" [J Pharmacol Sci 141 (2019) 49-55][J]. J Pharmacol Sci, 2020, 143(3):242.
- [19] WANG S, ZHAO P, ZHANG Y, et al. The therapeutic effects of curcumin in early septic acute kidney injury: An experimental study[J]. Drug Des Devel Therapy, 2021, 15:4243-4255.
- [20] BUYUKLU M, KANDEMIR F, OZKARACA M, et al. Beneficial effects of lycopene against contrast medium-induced oxidative stress, inflammation, autophagy, and apoptosis in rat kidney[J]. Hum Exp Toxicol, 2015, 34(5):487-496.
- [21] SUN S, ZHANG T, NIE P, et al. A novel rat model of contrast-induced acute kidney injury[J]. Int J Cardiol, 2014, 172:e48-e50.
- (收稿日期:2022-09-27 修回日期:2023-03-26)
-
- (上接第 1445 页)
- [16] BERDYSHE V E V, SERBAN K A, SCHWEITZER K S, et al. Ceramide and sphingosine-1 phosphate in COPD lungs[J]. Thorax, (2021-01-29) [2022-05-26]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33514670/>.
- [17] PETRACHE, IRINA, NATARAJAN, et al. Ceramide upregulation causes pulmonary cell apoptosis and emphysema-like disease in mice[J]. Nat Med, 2005, 11(5):491-498.
- [18] CARETTI A, VASSO M, BONEZZI F T, et al. Myriocin treatment of CF lung infection and inflammation: Complex analyses for enigmatic lipids[J]. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol, 2017, 390(8):775-790.
- [19] BODAS M, MIN T, VIJ N. Lactosylceramide-accumulation in lipid-rafts mediate aberrant-autophagy, inflammation and apoptosis in cigarette smoke induced emphysema[J]. Apoptosis, 2015, 20(5):725-739.
- (收稿日期:2022-07-27 修回日期:2023-02-27)