

三种淀粉样前体蛋白胞外结构域突变体的建立及功能验证*

张鹏^{1,2}, 崔冬冰^{1,2}, 舒莉萍^{1,2**}, 范安然^{1,2**}

(1. 贵州医科大学 细胞工程生物医药技术国家地方联合工程实验室, 组织工程与干细胞实验中心, 贵州省再生医学重点实验室, 贵州 贵阳 550004; 2. 中国医学科学院 成体干细胞转化研究重点实验室, 贵州 贵阳 550004)

[摘要] 目的: 构建 3 种淀粉样前体蛋白 (APP) 胞外结构域突变体细胞株并进行功能的初步验证。方法: 通过 Touch down PCR 的方法扩增 E1 结构域缺失的 APP695 片段以及 E1 和信号肽双缺失的片段, 采用融合 PCR 的方法扩增 E2 结构域缺失的 APP695 片段, 并将获得的片段连接于 pCMV-APP695 载体中得到 APP 胞外结构域突变体质粒; 质粒转染 CHO 细胞后, 添加 G418 筛选表达 APP 胞外结构域突变体的单克隆细胞系; 通过 Western blot 方法检测 APP 胞外结构域突变体的表达及胞外分泌水平, 分析信号肽对该突变体分泌的影响。结果: 成功获得了 APP 的 E1 结构域突变体、E1/信号肽双缺失突变体以及 E2 结构域突变体细胞株, 且 APP 突变体可以正常表达和分泌, 但是信号肽缺失后 APP 突变体可以表达、而不能分泌。结论: APP 的 E1 和 E2 结构域对 APP 蛋白的胞外分泌无影响。

[关键词] 淀粉样前体蛋白; 胞外结构域; 突变体; 信号肽; 神经退行性疾病

[中图分类号] R741.02 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1000-2707(2019)06-0626-06

DOI: 10.19367/j.cnki.1000-2707.2019.06.002

The Role of Extracellular Domain of Amyloid Precursor Protein on Amyloid Precursor Protein Expression and Secretion

ZHANG Peng^{1,2}, CUI Dongbing^{1,2}, SHU Liping^{1,2}, FAN Anran^{1,2}

(1. National & Guizhou Joint Engineering Laboratory for Cell Engineering and Biomedicine Technique, Center for Tissue Engineering and Stem Cell Research, Guizhou Province Key Laboratory of Regenerative Medicine, Guizhou Medical University, Guiyang 550004, Guizhou, China; 2. Key Laboratory of Adult Stem Cell Translational Research, Chinese Academy of Medical Sciences, Guiyang 550004, Guizhou, China)

[Abstract] Objective: To generate cells that express amyloid precursor protein (APP) with different extracellular domain (ED) deletion or signal peptide (SP), and evaluate role of ED and SP on APP expression and secretion. **Methods:** APP695 fragments with ED1 deletion and APP fragments with both ED1 and signal peptide (SP) deletion were amplified using touchdown PCR. The APP fragments with ED2 deletion were obtained with fusion PCR. These fragments were further ligated to pCMV-APP695 expression vector to get recombinant expression constructs, which were separately transfected into CHO cells and screened with G418 to get single clone. The effects of ED and SP on expression and secretion of APP were assessed using Western blot. **Results:** Three cell lines that express APP with ED1 deletion, or ED2 deletion, or ED1&SP deletion respectively were established successfully. The mutants of APP with SP could express and secrete APP fragments in the cells, while the APP mutant without SP could only express APP fragments in the cell but cannot be extracellularly secreted.

*[基金项目] 贵州省科技合作计划项目[黔科合 LH 字(2015)7337]; 国家自然科学基金项目(31660316); 贵阳市人民政府-贵州医科大学科学技术联合基金(GY2017-8)

**通信作者 E-mail: 275127171@qq.com; 415165261@qq.com

网络出版时间: 2019-06-22 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/52.1164.R.20190622.0723.002.html>

Conclusions: Both ED1 and ED2 of APP do not influence the secretion of APP.

[**Key words**] amyloid precursor protein; extracellular domain; mutants; signal peptide; neurodegenerative disease

阿尔茨海默综合征(alzheimer's disease, AD)是最常见的一种神经退行性疾病,也是痴呆症的最常见类型,全球范围内每 7 s 就有一个 AD 新病人产生^[1]。尽管 AD 的病原学以及病理学传播机制仍存在很大争议,但是淀粉样前体蛋白(amyloid precursor protein, APP)及其加工被认为在 AD 的发病机制中起着重要作用^[2]。APP 是一种 I 型跨膜蛋白,是 AD 病人大脑中淀粉样斑块中的 β -淀粉肽的来源^[3],但对 APP 的各个结构域的空间结构、以及各个结构域怎样通过与其他分子相互作用发挥功能仍不清楚^[4]。APP 的胞外结构域,特别是可以与多种胞外蛋白相互作用的 E1 和 E2 结构域(extracellular domain 1, extracellular domain 2),可能是 APP 激活信号通路及发挥生理学功能的重要原因^[5]。因此,为研究 APP 胞外结构域的功能,本研究建立了 3 种表达 APP 胞外结构域突变体的细胞株及表达野生型 APP 的细胞株,并对这几种细胞株是否可以作为 APP 结构域功能研究的有利模型进行筛选,报告如下。

1 材料与方法

1.1 主要材料

DMEM 基础培养基、细胞培养用血清(FBS)、磷酸盐缓冲液(PBS)、0.25% 胰消化酶、100 × 非必需氨基酸(NEAA)、L-谷氨酰胺、 β -巯基乙醇及 100 000 U/L 青链霉素均来自 Gibco 公司, FuGENE 6 质粒转染试剂购自 Roche 公司, 6E10 抗体、G418 及 β -巯基乙醇购自 Sigma 公司, 羊抗鼠 IgG 来自北京索莱宝科技有限公司, 24 孔板、T25 培养瓶及 T75 培养瓶购自 Corning 公司, 质粒小提试剂盒购自天根公司; 2 × hot start PCR 预混液购自 TAKARA 公司, T4 连接酶、内切酶 *SgfI* 及 *MluI* 购于 NEB 公司, pCMV-APP695 质粒购自 Addgene, CHO 细胞为本实验室保存。

1.2 方法

1.2.1 CHO 细胞培养 CHO 细胞系培养于 T75 的细胞培养瓶, 并使用 DMEM 完全培养基进行培养, 完全培养基组成包括 10% 胎牛血清、1% 非必需氨基酸、10 mmol/L β -巯基乙醇、1% 谷氨酰胺及

1% 青链霉素; 每天观察细胞生长状态, 3 d 换 1 次液, 细胞生长融合度至 90% 时进行传代培养。

1.2.2 APP 突变体片段扩增 (1) 使用 Touchdown PCR 的方法进行 APP 突变体片段的扩增, 25 μ L 反应体系: APP695 质粒 2 μ L、PCR mix 12.5 μ L、上游引物 0.5 μ L、下游引物 0.5 μ L, 最后用无 RNA 酶水补足体积到 25 μ L。Touchdown PCR 包括 2 个阶段: 阶段 1 为降落阶段, 以比引物 T_m 值高 10 $^{\circ}$ C 的温度作为起始退火温度进行 PCR 扩增, 然后每经过一个循环退火温度降低 1 $^{\circ}$ C, 直到退火温度降到比 T_m 值低 5 $^{\circ}$ C 为止, 共进行 15 个循环; 阶段 2 为普通扩增阶段, 在此阶段中, 使用第 1 个阶段中所确定的最终退火温度进行扩增。(2) 使用融合 PCR 构建 E2 结构域突变体, 融合 PCR 是将多个基因片段连接起来的 PCR 方法, 主要包括 3 个阶段: 第 1 个阶段为常规 PCR 阶段, 主要扩增 E2 上游和下游基因, 反应条件和反应体系同 Touchdown PCR; 第 2 阶段为融合阶段, 25 μ L 反应体系为上游片段 2 μ L、下游片段 2 μ L、PCR mix 12.5 μ L、最后用无 RNA 酶水补足体积到 25 μ L, 反应条件为 95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min, 94 $^{\circ}$ C 变性 20 s、57 $^{\circ}$ C 退火 20 s、72 $^{\circ}$ C 延伸 40 s、进行 10 个循环, 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min; 第 3 阶段是融合后扩增阶段, 取第 2 阶段的反应管加入上下游特异性引物, 进行 15 个循环。最后琼脂糖电泳进行验证。

1.2.3 APP 突变体蛋白表达检测 使用 Western blot 的方法鉴定稳定转染细胞系中 APP 突变体的表达, 步骤为: 配制 10% 分离胶 10 mL, 并用 70% 的酒精进行液封, 分离胶凝好后配制 4 mL 浓缩胶。细胞裂解液以及上清的上样体积为 20 μ L, 将其分别于 2 × 上样缓冲液混匀后, 置于 100 $^{\circ}$ C 水浴煮 10 min 即可上样。指示带泳至胶底部后停止电泳, 4 $^{\circ}$ C 转膜过夜。转膜完成后, 取出 PVDF 膜, 用 5% 的脱脂牛奶室温封闭 1 h, 加入相应一抗 4 $^{\circ}$ C 过夜。次日取出 PVDF 膜用纯水漂洗 3 次, 10 min/次。然后加入二抗室温孵育 1 h, 纯水漂洗 3 次, 10 min/次。用 ECL 液室温避光孵育, 暗室显影。

1.2.4 细胞转染 在 CHO 细胞生长融合度为 90% 时进行传代。使用细胞计数板按照 1×10^5 密度接种于 24 孔板中, 培养 24 h 后换成新鲜培养

液;分别将 Opti-MEM 50 μ L 与 Fugen HD 3 μ L 试剂混合,将 APP 突变体质粒 1 μ g 与 Opti-MEM 50 μ L混合,然后将稀释后的质粒与稀释后的 Fugen HD 试剂混合后室温孵育 15 min,最后加入 24 孔板,每孔 50 μ L,转染 6 h 后,换成新鲜培养液。

1.2.5 稳定转染细胞系的筛选 在 CHO 细胞转染 APP 突变体质粒后 24 h,换成筛选培养基,筛选培养基组成为完全培养基加 1 g/L 的 G418,每天观察细胞生长状态,以未转染的 CHO 细胞作为对照。第 7 天对照组细胞基本全部死亡,实验组部分细胞继续存活;在存活细胞融合度至 90% 时,胰酶消化细胞,稀释至 10 000 个/L,然后以 100 μ L/孔接种于 96 孔板,细胞贴壁后,在显微镜下筛选只含 1 个细胞的孔,并做标记,标记孔内即为单克隆细胞系。细胞融合度至 90% 时进行传代扩大培养,此后降低 G418 浓度为 400 mg/L 维持转基因的表达。

2 结果

2.1 APP 蛋白 E1 结构域突变体细胞株的建立

通过 Touch down PCR 方法,将 APP 基因中编码 E1 结构域(extracellular domain 1)的 59 ~ 608 bp 片段进行扩增,获得了长度为 1 502 bp 的编码片段(图 1A 中的 1~5 泳道)。将 E1 结构域突变后的片段与 pCMV6 载体进行重组,使用 *SgfI* 和 *MluI* 双酶切验证,结果表明重组质粒中切出大小为 1 502 bp 的片段(图 1B 泳道 1~2,泳道 3~4 为未酶切质粒),证明载体进行了正确重组。最后通过 G418 抗性筛选出表达 E1 结构域突变体的单克隆细胞株并验证其表达和分泌。细胞总蛋白在 75 kDa 附近有杂交条带,且与预测分子量一致,证明了重组载体可以正常表达(图 1C 泳道 1~8)。细胞培养上清液中也有与预测分子量一致的条带,证明了其可以正常分泌(图 1D 泳道 1、3~7)。

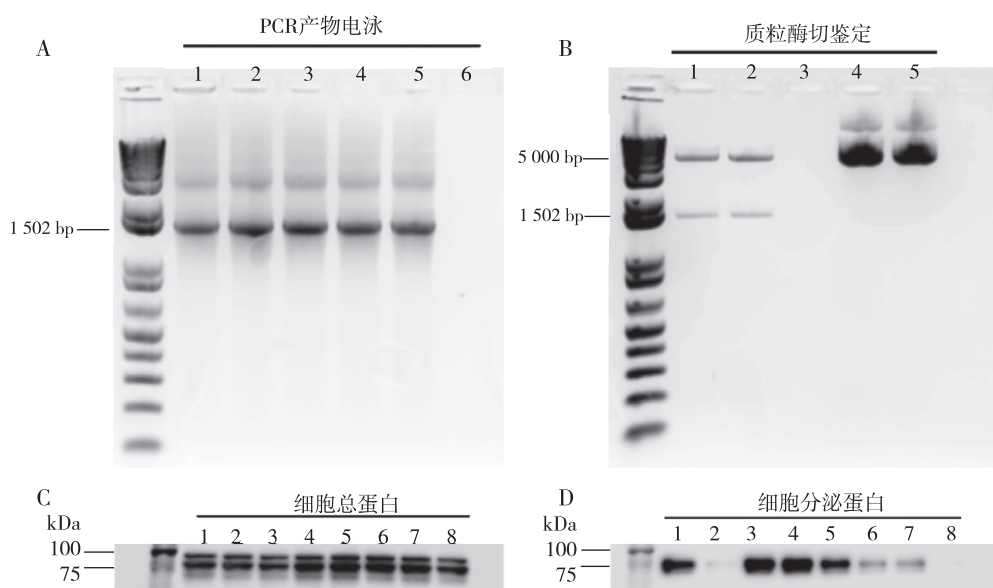


图 1 APP 蛋白 E1 结构域突变体细胞株的建立

Fig. 1 The effect of ED1 deletion on APP expression and secretion

2.2 APP 蛋白 E2 结构域突变体细胞株的建立

通过常规 PCR 的方法,获得了 APP 基因中位于 E2 结构域上游的基因片段,长度为 873 bp;同时获得位于 E2 结构域下游的基因片段,长度为 582 bp(图 2A),然后通过融合 PCR 的方法将上下游片段连接,获得了长度约为 1 500 bp 的 E2 结构域编码序列缺失的 APP 片段(图 2B)。使用 E2 结构域突

变的片段与 pCMV6 载体构建重组载体,通过 *SgfI* 和 *MluI* 双酶切获得 5 000 bp 和 1 500 bp 目的片段,证实了载体的正确重组(图 2C)。通过 G418 抗性筛选出单克隆细胞株,使用 Western blot 检测细胞内和细胞培养液中 dE1 突变体蛋白表达,结果证实 dE1 突变体不仅在细胞内表达(图 2D),并且可以正常分泌到胞外空间(图 2E)。

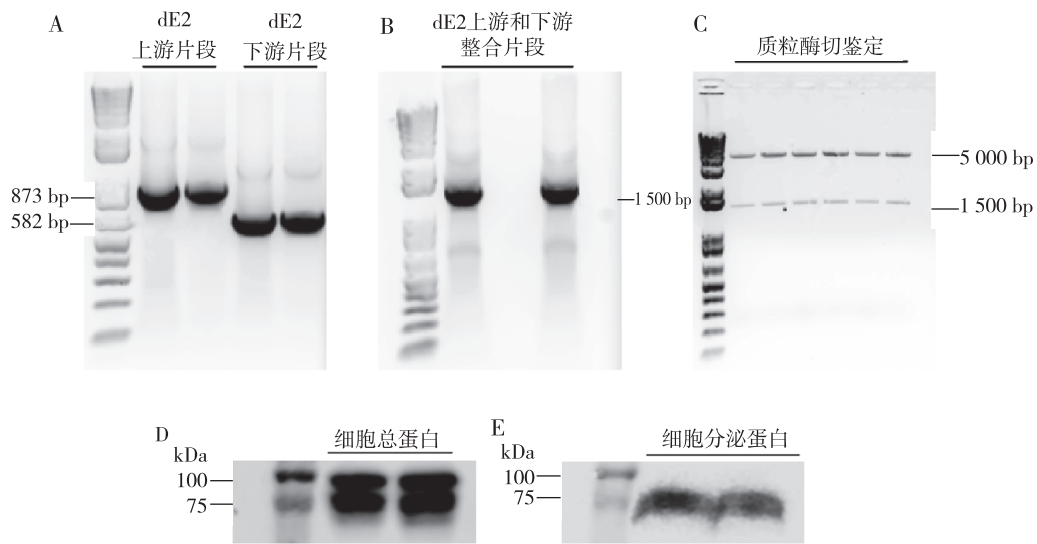


图2 APP 蛋白 E2 结构域突变体细胞株的建立

Fig. 2 The effect of ED2 deletion on APP expression and secretion

2.3 信号肽在调控胞外结构域的释放

为了研究信号肽 (signal peptide, SP) 在 APP 分泌中的作用,本研究将载体通过 *SgfI* 和 *MluI* 进行双酶切,去除了大小约为 3 000 bp 的 APP 全长片段 (如图 3A 泳道 1),然后与 PCR 获得了信号肽缺失的 dE1-APP 片段 (图 3A 泳道 2) 连接后获得了信号肽缺失的 dE1-APP 重组载体 (dE1-APP Δ SP, 图 3B)。Western blot 结果显示信号肽缺失后,APP 虽然可以在细胞内表达 (图 3C),但是不能正常分泌到细胞外空间 (图 3D)。

3 讨论

AD 的主要病理学特点是大脑中形成淀粉样斑块和神经纤维结节,其中淀粉样斑块是由于 APP 切割产物 A β 在细胞外积累形成的,而神经纤维结是由于磷酸化的微管蛋白 (Tau) 沉积形成^[6-7]。尽管 AD 的病原学以及病理学传播机制仍存在很大争议,但是由于 APP 或者其酶切产物可以导致 Tau 蛋白磷酸化、突触功能异常、神经元死亡等现象^[8-9],据此形成了 APP 处于 AD 疾病形成的中心位置的假说。所以对 APP 功能的研究对于揭示 AD 的发病机制的理解具有重要意义。因此,本研究建立起 3 种 APP 的突变体,并希望通过观察 3 种 APP 的突变体对 APP 蛋白的胞外分泌有无影响,探索 APP 结构跟功能之间的关系。

APP 被 α -分泌酶切割后,氨基端会释放形成可溶性的胞外结构域片段 (sAPP α) 和由 83 个氨基

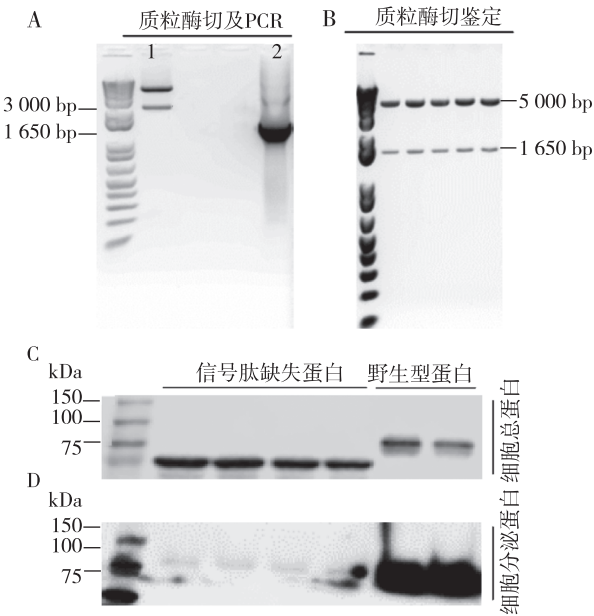


图3 APP 蛋白信号肽缺失和 E1 结构域突变体细胞株的建立

Fig. 3 The effect of ED1 & SP deletion on APP expression and secretion

酸组成的羧基端 (C83 会继续固定在细胞膜上)。停留在细胞膜上的 C83 会被 γ 分泌酶继续切割形成 P3 肽段和 APP 胞内结构域片段 (APP intracellular domain, AICD),这个过程被称为 APP 的非淀粉样形成过程^[10-11]。与此类似,APP 还可以被 β -分泌酶切割形成可溶性的胞外结构域片段 (sAPP β) 以及与细胞膜结合的 99 个氨基酸组成的 C99 片段,C99 片段可以被 γ 分泌酶继续切割形成具有神

经毒性的 A β 片段以及 AICD^[12]。APP 的这种多位点切割以及代谢产物的多样性使 APP 可以发挥多种生理学功能,但是也使 APP 的功能确定产生困难^[13]。因此合适的 APP 功能的体外研究模型对于确定 APP 的正常生理功能和在 AD 病理学中的功能至关重要,本研究建立的几种细胞模型,都可以正常表达 APP 及其突变体蛋白,并且不会影响它们的正常分泌,因此可以广泛以用于 APP 功能的确定。

APP 的功能与其结构密切相关,在过去的研究中对于 APP 结构以及对应结构域的具体生物学功能进行了大量研究。APP 胞外结构域主要是由 E1 和 E2 两个结构域以及插入在两者之间的 Kunitz 结构域(KPI)以及酸性结构域(AcD)组成^[14]。E1 结构域中含有肝素结合亚结构域(heparan binding subdomain, HBD),HBD 具有正电荷表面,能够和带有负电荷的分子结合,HBD 结构域与生长因子及其受体类似蛋白的结合位点相似^[15]。HBD 区域可以与 APP 或者淀粉样前体蛋白类似蛋白(APLP)之间通过二硫键形成同源二聚体或异源二聚体,从而增加 APP 在细胞表面的稳定性^[16-17]。此外,有研究发现 APP 的 E1 结构域可以作为类生长因子促进神经节的生长^[15];Behr 等^[18]发现 E1 区域还可以与胶原蛋白 I 结合。E1 结构域还可以作为肝素的结合位点,在 APP 形成二聚体的过程中发挥重要作用^[19]。在 E2 结构域的近膜端还含有第 2 个 HBD,其对于硫酸肝素蛋白多糖(HSPG)具有低亲和力的结合能力^[20]。E2 与 HSPG 的结合可以增加 APP 与其低亲和性受体的结合能力^[21-22]。Dahms 等^[23]通过结晶学手段发现 E2 结构域可以作为 Cd²⁺ 的结合位点,与 Cd²⁺ 结合后,可以增加 E2 结构域的稳定性。Mayer 等^[24]的另一项研究发现 E2 结构域可以通过与金属离子的结合调节 APP 寡聚物的形成。E2 结构域也可以做作为硫化肝素的结合位点,通过与硫化肝素结合后增加 APP 的亲水性,从而有利于 APP 与其它辅因子结合^[20]。尽管如此,APP 的胞外结构域 E1 和 E2 的生理学作用仍有待于进一步研究,与 E1 和 E2 结构域相互作用的大量分子也有待于进一步扩充,并且不同的互作分子与 E1 和 E2 结构域结合后在 AD 中发挥什么作用,这些问题对于理解 AD 的疾病进程十分重要。本研究建立的 E1 和 E2 结构域突变体细胞株可以作为确定 E1 和 E2 结构域生物学功能、发现其互作蛋白的有效模型,在解决上述

问题中起到关键作用。

APP 的定位和胞内转运对于 APP 的加工和处理十分重要,特定基序缺失的 APP,其 A β 的产生会减少^[11]。APP 蛋白序列中的 YENPTY 基序对于 APP 内吞和加工发挥重要作用^[25]。在 APP 蛋白中,其 1~18 号氨基酸是 SP 序列,APP 的信号肽其作用是在编码 APP 的基因翻译后,将 APP 前体蛋白导向到内质网中,APP 进入内质网后会产生蛋白折叠、磷酸化和糖基化等,同时也是其进入细胞膜转运系统的关键步骤。本研究发现缺失信号肽后,尽管 APP 可以在细胞内表达,但是其向细胞外的分泌会受到影响。

综上所述,本研究成功构建了 3 种淀粉样前体蛋白胞外结构域突变体细胞株,并且通过 Western blot 验证了不同细胞株中 APP 蛋白的表达及分泌。构建的细胞株可在 APP 正常生理学功能和在 AD 病理学功能的研究中发挥重要作用。

4 参考文献

- [1] FERRI C P, PRINCE M, BRAYNE C, et al. Global prevalence of dementia: a delphi consensus study [J]. Lancet, 2005, 366 (9503): 2112-2117.
- [2] BEEL A J, MOBLEY C K, KIM H J, et al. Structural studies of the transmembrane C-terminal domain of the amyloid precursor protein (APP): does APP function as a cholesterol sensor[J]. Biochemistry, 2008, 47 (36): 9428-9446.
- [3] HARDY J. Pathways to primary neurodegenerative disease [J]. Neurologia, 2002, 17 (8): 399-401.
- [4] AYDIN D, WEYER S W, MULLER U C. Functions of the APP gene family in the nervous system; insights from mouse models [J]. Exp Brain Res, 2012, 217 (3-4): 423-434.
- [5] DEYTS C, THINAKARAN G, PARENT A T. APP receptor? to be or not to be [J]. Trends Pharmacol Sci, 2016, 37 (5): 390-411.
- [6] SELKOE D J, SCHENK D. Alzheimer's disease: molecular understanding predicts amyloid-based therapeutics [J]. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 2003, 43: 545-584.
- [7] ROCKENSTEIN E, MALLORY M, MANTE M, Et al. Early formation of mature amyloid-beta protein deposits in a mutant APP transgenic model depends on levels of A β (1-42) [J]. J Neurosci Res, 2001, 66 (4): 573-582.

- [8] GOTZ J, CHEN F, VAN DORPE J, et al. Formation of neurofibrillary tangles in P301 τ transgenic mice induced by A β 42 fibrils [J]. *Science*, 2001, 293 (5534): 1491–1495.
- [9] LIU S, BREITBART A, SUN Y, et al. Blocking the apolipoprotein E/amyloid beta interaction in triple transgenic mice ameliorates Alzheimer's disease related amyloid beta and tau pathology [J]. *J Neurochem*, 2014, 128 (4): 577–591.
- [10] HAASS C, KAETHER C, THINAKARAN G, et al. Trafficking and proteolytic processing of APP [J]. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2012, 2 (5): a006270.
- [11] THINAKARAN G, KOO E H. Amyloid precursor protein trafficking, processing, and function [J]. *J Biol Chem*, 2008, 283 (44): 29615–29619.
- [12] VAN DER KANT R, GOLDSTEIN L S. Cellular functions of the amyloid precursor protein from development to dementia [J]. *Dev Cell*, 2015, 32 (4): 502–515.
- [13] NHAN H S, CHIANG K, KOO E H. The multifaceted nature of amyloid precursor protein and its proteolytic fragments: friends and foes [J]. *Acta Neuropathol*, 2015, 129 (1): 1–19.
- [14] COBURGER I, HOEFGEN S, THAN M E. The structural biology of the amyloid precursor protein APP - a complex puzzle reveals its multi-domain architecture [J]. *Biol Chem*, 2014, 395 (5): 485–498.
- [15] REINHARD C, HEBERT S S, DE STROOPER B. The amyloid-beta precursor protein: integrating structure with biological function [J]. *EMBO J*, 2005, 24 (23): 3996–4006.
- [16] ROSSJOHN J, CAPPAL R, FEIL S C, et al. Crystal structure of the N-terminal, growth factor-like domain of Alzheimer amyloid precursor protein [J]. *Nat Struct Biol*, 1999, 6 (4): 327–331.
- [17] STAHL R, SCHILLING S, SOBA P, et al. Shedding of APP limits its synaptogenic activity and cell adhesion properties [J]. *Front Cell Neurosci*, 2014, 8:410.
- [18] BEHER D, HESSE L, MASTERS C L, et al. Regulation of amyloid protein precursor (APP) binding to collagen and mapping of the binding sites on APP and collagen type I [J]. *J Biol Chem*, 1996, 271 (3): 1613–1620.
- [19] DAHMS S O, HOEFGEN S, ROESER D, et al. Structure and biochemical analysis of the heparin-induced E1 dimer of the amyloid precursor protein [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2010, 107 (12): 5381–5386.
- [20] REINHARD C, BORGENS M, DAVID G, et al. Soluble amyloid-beta precursor protein binds its cell surface receptor in a cooperative fashion with glypican and syndecan proteoglycans [J]. *J Cell Sci*, 2013, 126 (21): 4856–4861.
- [21] SARRAZIN S, LAMANNA W C, ESKO J D. Heparan sulfate proteoglycans [J]. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2011, 3 (7): 1–33.
- [22] MATSUO I, KIMURA-YOSHIDA C. Extracellular distribution of diffusible growth factors controlled by heparan sulfate proteoglycans during mammalian embryogenesis [J]. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 2014, 369 (1657): 1–9.
- [23] DAHMS S O, KONNIG I, ROESER D, et al. Metal binding dictates conformation and function of the amyloid precursor protein (APP) E2 domain [J]. *J Mol Biol*, 2012, 416 (3): 438–452.
- [24] MAYER M C, KADEN D, SCHAUENBURG L, et al. Novel zinc-binding site in the E2 domain regulates amyloid precursor-like protein 1 (APLP1) oligomerization [J]. *J Biol Chem*, 2014, 289 (27): 19019–19030.
- [25] HAASS C, KOO E H, TEPLow D B, et al. Polarized secretion of beta-amyloid precursor protein and amyloid beta-peptide in MDCK cells [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1994, 91 (4): 1564–1568.

(2019-03-08 收稿, 2019-05-29 修回)

中文编辑: 吴昌学; 英文编辑: 张启芳