

## 螺旋藻多糖超声辅助提取工艺优化及其抗肝癌活性研究

李敏, 姚超, 贾云晰, 李敏, 王鑫, 张美婷, 扈瑞平, 苑红\*, 薛慧婷\*

内蒙古医科大学基础医学院, 内蒙古 呼和浩特 010059

**摘要:** 目的 优化鄂尔多斯钝顶螺旋藻多糖 (*Spirulina platensis* polysaccharides, SPP) 提取工艺并探讨 SPP 通过调控细胞乙酰化水平抑制肝细胞癌 (hepatocellular carcinoma, HCC) 的作用。方法 采用热水提取法、反复冻融法、超声辅助提取法提取 SPP, 单因素实验考察 3 种方法对 SPP 提取率的影响; 利用响应面法优化 SPP 的提取工艺。利用 DEAE-纤维素分离 SPP 得到中性糖级分 (neutral polysaccharides from *S. platensis*, SPPN) 和酸性糖级分 (acidic polysaccharides from *S. platensis*, SPPA), 通过 CCK-8 实验检测 SPP 及其各多糖级分对 HCC 细胞增殖的影响; 利用 1 mg/mL SPP 或 SPPN 处理 HepG2 细胞 24 h, 检测细胞内多种酰化修饰水平; 利用 1 μmol/L 去乙酰化酶抑制剂 (histone deacetylase inhibitor, HDACI) 及 1 mg/mL SPPN 联合处理 HepG2 细胞, 检测细胞活力及半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3 (cysteine-aspartate protease-3, Caspase-3)、B 细胞淋巴瘤-2 (B-cell lymphoma-2, Bcl-2) 蛋白表达; 构建 Hepa1-6 肝癌荷瘤小鼠模型, 连续 7 d ig SPPN, 考察 SPPN 的体内抗肿瘤作用。结果 超声辅助提取法 SPP 的提取率最高; 通过响应面试验得到最优工艺条件为超声时间 10 min、超声功率 300 W、液料比 25:1, 此条件下 SPP 提取率为 (10.42±0.30) %。SPPA 显著促进 HepG2 细胞增殖 ( $P<0.01$ ), 而 SPPN 对 HCC 细胞均有显著杀伤作用 ( $P<0.01$ ), 对正常小鼠肝细胞无明显影响; 荷瘤小鼠模型进一步证实 SPPN 具有抗肿瘤作用 ( $P<0.05$ )。SPP 和 SPPN 能够改变细胞内多种酰化修饰水平, 其中对乙酰化水平的影响较大。HDACI 与 SPPN 联合处理显著增强 SPPN 对 HCC 细胞的杀伤作用 ( $P<0.01$ ), 并显著降低细胞内 Caspase-3、Bcl-2 蛋白表达水平 ( $P<0.01$ )。结论 响应面优化后 SPP 的提取率为 (10.42±0.30) %, 且分级后的 SPPN 可通过调控细胞乙酰化水平抑制 HCC 细胞增殖。

**关键词:** 螺旋藻多糖; 中性糖级分; 超声辅助法; 响应面优化; 肝细胞癌; 乙酰化修饰

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2025)24-9044-11

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2025.24.016

## Optimization of ultrasonic assisted extraction process for *Spirulina platensis* polysaccharides and study on their anti-liver cancer activity

LI Min, YAO Chao, JIA Yunxi, LI Min, WANG Xin, ZHANG Meiting, HU Ruiping, YUAN Hong, XUE Huiting

School of Basic Medical Sciences, Inner Mongolia Medical University, Hohhot 010059, China

**Abstract: Objective** To optimize the extraction process of *Spirulina platensis* polysaccharides (SPP) and explore the role of SPP in inhibiting hepatocellular carcinoma (HCC) through the regulation of cellular acetylation levels. **Methods** Hot water extraction method, repeated freeze-thaw method and ultrasound assisted extraction method were used to extract SPP. Single factor experiments were conducted to investigate the effects of these three methods on the extraction rate of SPP. The extraction process was optimized using response surface methodology. The crude polysaccharides were fractionated by DEAE cellulose chromatography, yielding neutral (SPPN) and acidic (SPPA) polysaccharides. The effects of various fractions on the proliferation of HCC cells were detected by CCK-8 experiment. HepG2 cells were treated with 1 mg/mL SPP or SPPN for 24 h, the levels of various acylation modifications in cells was detected. HepG2 cells were treated with 1 μmol/L histone deacetylase inhibitor (HDACI) and 1 mg/mL SPPN, the cell viability and protein expressions of cysteine aspartate protease-3 (Caspase-3) and B-cell lymphoma-2 (Bcl-2) were detected. Hepa1-6 liver cancer mouse model was constructed and continuously ig SPPN for 7 d to investigate the *in vivo* anti-tumor effect of SPPN. **Results** The ultrasound assisted extraction method had the highest extraction rate for SPP. The optimal process conditions obtained through response

收稿日期: 2025-07-10

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (32060217); 内蒙古自治区青年拔尖人才项目; 内蒙古医科大学致远人才项目 (ZY20242103); 内蒙古医科大学面上项目 (2025MS08075); 内蒙古医科大学“创客培育”项目 (101322025082)

作者简介: 李敏 (1999—), 硕士研究生, 研究方向为天然产物构效关系。E-mail: limin1110@126.com

\*通信作者: 薛慧婷, 副教授, 研究生导师, 从事药食两用药物结构与功能研究。E-mail: xueht911@immu.edu.cn

苑红, 副教授, 研究生导师, 从事代谢性疾病研究。E-mail: 20080292@immu.edu.cn

surface testing were ultrasonic time of 10 min, ultrasonic power of 300 W, and liquid to material ratio of 25 : 1. Under these conditions, the SPP extraction rate was  $(10.42 \pm 0.30)\%$ . SPPA significantly promoted proliferation of HepG2 cells ( $P < 0.01$ ), while SPPN had a significant killing effect on HCC cells ( $P < 0.01$ ), with no significant effect on normal mouse liver cells. The tumor bearing mouse model further confirmed that SPPN had anti-tumor effects ( $P < 0.05$ ). SPP and SPPN could alter various levels of intracellular acylation modifications, with a significant impact on acetylation levels. The combined treatment of HDACI and SPPN significantly enhanced the killing effect of SPPN on HCC cells ( $P < 0.01$ ), and significantly reduced the expression levels of Caspase-3 and Bcl-2 proteins in cells ( $P < 0.01$ ). **Conclusion** The extraction rate of SPP after response surface optimization is  $(10.42 \pm 0.30)\%$ , and the graded SPPN could inhibit HCC cell proliferation by regulating cell acetylation levels.

**Key words:** *Spirulina platensis* polysaccharide; neutral polysaccharides; ultrasound assisted method; response surface optimization; hepatocellular carcinoma; acetylation modification

肝细胞癌 (hepatocellular carcinoma, HCC) 是起源于肝内胆管上皮细胞或肝细胞的恶性肿瘤, 具有起病隐匿、恶性度高、进展快、预后差和死亡率高等特点<sup>[1]</sup>。HCC 发生过程中存在各种表观遗传修饰, 如 DNA 甲基化、组蛋白修饰、染色质重塑、非编码 RNAs、m6A 甲基化等<sup>[2]</sup>。近年来, 蛋白质翻译后修饰 (protein translational modifications, PTMs) 的研究成为生物医学领域的热点之一。PTMs 在多种生物学过程中都发挥了重要的作用, 包括 DNA 复制<sup>[3]</sup>、细胞分化<sup>[4]</sup>、胚胎发育<sup>[5]</sup>和疾病发生<sup>[6-7]</sup>等。目前已发现多种 PTMs 方式, 包括乙酰化、巴豆酰化、乳酸化、琥珀酰化、赖氨酸 3-羟基丁酰化、丙二酰化等。PTMs 异常存在于 HCC 的发生、发展过程中。研究发现, 转移相关基因 1 (metastasis associated 1, MTA1) 通过降低组蛋白 H1 家族成员 H1.2 的磷酸化水平促进 HCC 的发展进程<sup>[8]</sup>; 肿瘤坏死因子受体相关蛋白 6 (tumor necrosis factor receptor associated factor 6, TRAF6) 可通过与组蛋白去乙酰化酶 3 (histone deacetylase 3, HDAC3) 的 K63 连接的泛素链相互作用并泛素化, 从而调控 c-Myc 的表达促进 HCC 的发生<sup>[9]</sup>。因此, 深入解析 PTMs 的调控机制, 有望为 HCC 的靶向治疗和个性化治疗策略开辟新途径。

螺旋藻 *Spirulina platensis* (Nostd.) Geitl 又名节旋藻, 是一种古老的蓝藻或蓝细菌。因其富含丰富的蛋白质、维生素、多糖以及多种脂肪酸和矿物质等<sup>[10]</sup>, 被广泛应用在饲料、医药及食品等领域。螺旋藻多糖 (*Spirulina platensis* polysaccharides, SPP) 主要为酸性多糖大分子物质, 结构复杂, 且大多与蛋白聚集<sup>[11]</sup>, 提取分离难度较大。目前多糖的提取多采用热水浸提法、冻融法、超声波提取法、碱提取法和酶法等<sup>[12-16]</sup>, 存在着耗时长、提取效率较低、成本高且多糖活性易破坏等缺点。近年来, 如何提

高植物多糖的提取效率并保全其活性, 成为国内外研究的核心问题。SPP 是一种生理活性多糖, 具有抗癌、抗氧化、免疫调节、抗炎、调节肠道微生物菌群等生物活性<sup>[17]</sup>。SPP 可以作为癌症患者的辅助治疗药物, 减轻放疗、化疗对人体的损伤<sup>[18]</sup>。近年来研究发现, SPP 具有明显的保肝作用, 可改善脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 诱导的小鼠肝组织病理形态学损伤及氧化应激状态, 降低肝组织相关蛋白酶水平、促炎因子、核因子- $\kappa$ B (nuclear factor- $\kappa$ B, NF- $\kappa$ B) 相关蛋白表达<sup>[19]</sup>。SPP 也可显著抑制人肝癌 7402 细胞增殖<sup>[20]</sup>, 因此 SPP 可能是治疗 HCC 的潜在药物。

目前, SPP 的提取方式仍需优化, 且 SPP 抑制 HCC 细胞增殖的作用机制仍不明确。课题组前期利用 DEAE-纤维素分离 SPP 得到中性糖级分 (neutral polysaccharides form *S. platensis*, SPPN) 和酸性糖级分 (acidic polysaccharides form *S. platensis*, SPPA), 发现 SPPN 显著抑制 HCC 细胞增殖。因此, 本研究利用响应面试验优化超声辅助提取 SPP 工艺, 并整合修饰组学分析 SPPN 抑制 HCC 细胞增殖的相关作用机制。研究结果不仅丰富了多糖分离纯化技术的理论体系, 并为 SPP 靶向治疗 HCC 提供实验依据。

## 1 材料

### 1.1 细胞

人肝癌 HepG2、Hep3B、HUH7 细胞, 小鼠肝癌 Hepa1-6 细胞及小鼠正常肝细胞 AML-12 均购自河南北纳创联生物科技有限公司, 由本课题组于  $-196^{\circ}\text{C}$  液氮中保存并常规传代培养。

### 1.2 动物

SPF 级雄性 BALB/c 小鼠, 4 周龄, 体质量 17~20 g, 购自北京维通利华实验动物技术有限公司, 许可证号 SCXK (京) 2021-0006。小鼠适应性饲养

1 周后开始实验, 环境温度 22 ℃, 自由进饮水。动物实验经内蒙古医科大学动物保护委员会批准(批准号 YKD202001015)。

### 1.3 药品与试剂

钝顶螺旋藻粉末 (KS250819) 购自内蒙古鄂尔多斯高原毛乌素沙地巴彦淖尔, 经内蒙古医科大学薛慧婷副教授鉴定为 *S. platensis* (Notdst.) Geitl<sup>[21]</sup>; DMEM 培养基 (批号 C3103)、胎牛血清 (批号 C04001) 购自上海 VivaCell 公司; 0.25% 胰蛋白酶 (批号 8123678)、青-链霉素双抗 (批号 15140122) 购自美国 Gibco 公司; CCK-8 细胞增殖-毒性检测试剂盒 (批号 BS350C)、PBS 缓冲液 (批号 BL302A) 购自安徽 Biosharp 公司; BCA 蛋白质浓度测定试剂盒 (批号 B5001) 购自北京 Lablead 公司; 兔抗  $\beta$ -actin 抗体 (批号 SC-69879) 购自美国 SANTA 公司; 兔抗半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3 (cystein-asparate protease-3, Caspase-3) 抗体 (批号 Ab13585) 购自英国 Abcam 公司、兔抗 B 细胞淋巴瘤-2 (B-cell lymphoma-2, Bcl-2) 抗体 (批号 WL01556) 购自沈阳万类生物科技有限公司; 鼠抗巴豆酰化抗体 (批号 PTM-502)、兔抗乳酸化抗体 (批号 PTM-1401RM)、鼠抗琥珀酰化抗体 (批号 PTM-419)、兔抗赖氨酸 3-羟基丁酰化抗体 (批号 PTM-1201RM)、鼠抗丙二酰化抗体 (批号 PTM-902)、兔抗乙酰化抗体 (批号 PTM-105RM) 购自杭州景杰生物科技有限公司; meilunbio 飞克特超敏 ECL 液 (批号 MA0186) 购自大连美伦生物技术有限公司; 葡萄糖标准品 (批号 PHR1000)、去乙酰化酶抑制剂 (histone deacetylase inhibitor, HDACI, 批号 SML0061, 质量分数  $\geq 98\%$ ) 购自德国 Merck 公司。

### 1.4 仪器

T2600 型紫外可见分光光度计 (上海佑科仪器仪表有限公司); SQP 型分析天平 (北京赛多利斯科学仪器有限公司); ScientzOS-IIIC 型超声粉碎机 (宁波新芝生物科技股份有限公司); DE-52 型纤维素 (北京索莱宝科技有限公司); G-150 型凝胶柱 (上海源叶生物科技有限公司); DL-CJ-IND II 型洁净工作台 (北京东联哈尔仪器制造有限公司); 牛鲍尔式 25\*16 型血球计数板 (上海市求精生化试剂仪器有限公司); L500-A 型医用离心机 (湖南湘仪实验室仪器开发有限公司); Forma<sup>TM</sup> II 型 CO<sub>2</sub> 细胞培养箱、MultiskanGO 型酶标仪 (美国 Thermo 公司); LIB50 型倒置显微镜 (日本 Olympus 公司); Mini-

PROTEAN<sup>®</sup> Tetra Cell 小型垂直电泳槽 (美国 Bio-Rad 公司); L-VET-TRANS2 型小型转印槽 (北京兰杰科技有限公司); eBlot Touch Imager<sup>TM</sup> 型电子压片成像仪 (上海易享特光电技术有限公司)。

## 2 方法

### 2.1 单因素实验考察 3 种提取方法对多糖提取率的影响

**2.1.1 热水提取法** 称取 0.025 g 葡萄糖标准品, 配制 0.1 mg/mL 母液。取母液 0~0.9 mL (梯度间隔为 0.1 mL) 于 1.5 mL 离心管中, ddH<sub>2</sub>O 补至 1.0 mL。每管加入 0.5 mL 6% 苯酚及 2.5 mL 浓硫酸, 室温静置 30 min。以空白管为对照, 检测各管溶液 490 nm 下的吸光度 (A) 值, 得到葡萄糖标准曲线方程  $y=9.0006x$ ,  $R^2=0.9894$ 。

称取 1 g 钝顶螺旋藻粉, 于 25 mL 蒸馏水中水浴浸提, 冷却至室温, 1 000 r/min 离心 10 min, 收集上清液, 计算多糖提取率。固定提取次数 1 次和水浴时间 4 h 2 个因素, 考察提取温度 (20、40、60、80 ℃) 对多糖提取率的影响, 确定最优提取温度; 固定提取次数 1 次和提取温度 60 ℃ 2 个因素, 考察水浴时间 (1、2、3、4、5 h) 对多糖提取率的影响, 确定最优水浴时间。

$$\text{多糖提取率} = C \times V \times N / M$$

$C$  为多糖质量浓度 (mg/mL);  $V$  为待测液定容体积 (mL);  $N$  为稀释倍数;  $M$  为螺旋藻干粉质量 (mg)

**2.1.2 反复冻融法** 称取 1 g 钝顶螺旋藻粉, 溶于 25 mL 蒸馏水中, 对 SPP 进行反复冻融, 1 000 r/min 离心 10 min, 收集上清液, 按 “2.1.1” 项下方法计算多糖提取率。固定条件冻结温度 -20 ℃, 冻结时间 3 h, 融化温度 30 ℃, 融化时间 20 min, 考察冻融次数 (0、1、2、3 次) 对多糖提取率的影响, 确定最优冻融次数。

**2.1.3 超声辅助提取法** 称取 1 g 钝顶螺旋藻粉, 溶于 25 mL 蒸馏水中, 超声辅助提取后 4 ℃ 静置 3 h, 收集上清液, 按 “2.1.1” 项下方法计算多糖提取率。固定超声时间 10 min、水浴温度 60 ℃、水浴时间 4 h 和液料比 25:1 4 个因素, 考察超声功率 (100、200、300、400、500、600 W) 对多糖提取率的影响, 确定最优超声功率; 固定超声功率 300 W、水浴温度 60 ℃、水浴时间 4 h 和液料比 25:1 4 个因素, 考察超声时间 (1、5、10、20 min) 对多糖提取率的影响, 确定最优超声时间; 固定超声功率 300 W、超声时间 10 min、水浴时间 4 h、液料比 25:1 4 个

因素, 考察水浴温度(20、40、60、80、100 °C)对多糖提取率的影响, 确定最优水浴温度; 固定超声功率300 W、超声时间10 min、水浴温度60 °C、液料比25:1 4个因素, 考察水浴时间(1、2、3、4、5 h)对多糖提取率的影响, 确定最优水浴时间; 固定超声功率300 W、超声时间10 min、水浴温度60 °C、水浴时间4 h 4个因素, 考察液料比(5:1、10:1、25:1、50:1)对多糖提取率的影响, 确定最优液料比。

## 2.2 响应面优化超声辅助提取 SPP 提取工艺

根据单因素实验考察结果, 确定超声时间、超声功率、液料比这3个因素对多糖提取率的影响较大。故选择超声时间、超声功率、液料比3因素及其3个水平, 通过Design Expert 13软件进行3因素3水平的试验设计(表1)。

表1 响应面分析系数和水平

Table 1 Response surface analysis factors and levels

水平	A(超声时间)/min	B(超声功率)/W	C(液料比)/(mL·g <sup>-1</sup> )
-1	5	100	10:1
0	10	300	25:1
1	15	600	40:1

## 2.3 SPPN 和 SPPA 的制备

DEAE-纤维素预处理并装柱后, 称取一定质量的SPP溶于蒸馏水, 配制成质量浓度为20 mg/mL的溶液, 4 500 r/min离心10 min后取上清, 将上清上样于平衡后的DEAE-纤维素色谱柱, 分别用2倍柱体积的超纯水和0.5 mol/L NaCl溶液进行梯度洗脱, 流动相体积流量为4 mL/min, 每12分钟收集1次洗脱液, 采用硫酸-苯酚法检测洗脱液糖含量, 以每管的A值为纵坐标, 收集的管数为横坐标绘制洗脱曲线图, 由洗脱曲线图确定收集洗脱液, 经浓缩、透析、冻干后, 依次得到中性糖组分SPPN和酸性糖组分SPPA。采用Shimadzu HPLC系统, 结合TSK-gel G4000 PWXL柱检测单糖组成。结果显示, SPPN主要由葡萄糖(76.3%)和半乳糖(23.7%)组成。

## 2.4 CCK-8 实验检测细胞活力

取对数生长期的细胞, 1 000 r/min离心5 min, 用含10%胎牛血清的DMEM完全培养基制成细胞悬液, 以8×10<sup>4</sup>个/mL接种于96孔板中, 每孔100 μL。用不同质量浓度(0.1、0.5、1.0、2.0 mg/mL)的SPP、SPPA、SPPN处理HepG2细胞; 用不同质

量浓度(0.5、1.0 mg/mL)的SPPN处理Hep3B、HUH7、Hepa1-6、AML-12细胞; 用不同浓度(10、50、100、500、1 000、2 000、6 000、10 000 nmol/L)的HDACI处理HepG2细胞; 用1 μmol/L HDACI、1 mg/mL SPPN、1 μmol/L HDACI+1 mg/mL SPPN处理HepG2细胞, 每孔200 μL, 在5%CO<sub>2</sub>、37 °C培养箱中培养24 h。另设置不含药物的对照组和不接种细胞不含药物的空白组。每孔加入10 μL CCK-8溶液, 继续培养1 h, 采用酶标仪检测450 nm处的A值, 计算细胞活力。

$$\text{细胞活力} = (A_{\text{实验}} - A_{\text{空白}}) / (A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}})$$

## 2.5 Hepa1-6 肝癌荷瘤小鼠模型的建立及给药

选取4周龄雄性BALB/c裸鼠, 腋下接种0.1 mL Hepa1-6细胞(1×10<sup>8</sup>个/mL), 构建肝癌荷瘤小鼠模型。观察小鼠腋下有明显突起, 肿瘤体积约为100 mm<sup>3</sup>时, 将小鼠分为模型组和SPPN(200 mg/kg)组, 每组5只。SPPN组ig 0.1 mL SPPN(80 mg/mL), 模型组ig等体积的生理盐水, 每天1次/d, 连续给药7 d。给药结束后, 小鼠麻醉后脱颈处死, 剥离肿瘤组织, 称定质量。

## 2.6 Western blotting 检测差异蛋白表达

取对数生长期的HepG2细胞接种于6孔板内, 设置对照组、SPP组和SPPN组。对照组加入完全培养基, SPP组加入1 mg/mL SPP, SPPN组加入1 mg/mL SPPN。另设置对照组、HDACI组、SPPN组和HDACI+SPPN组, 对照组加入完全培养基, HDACI组加入1 μmol/L HDACI, SPPN组加入1 mg/mL SPPN, HDACI+SPPN组加入1 μmol/L HDACI和1 mg/mL SPPN。培养24 h后, 收集细胞至1.5 mL离心管。加入含有1%蛋白酶抑制剂的裂解液提取细胞总蛋白质, BCA法测定蛋白浓度。蛋白样品经十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳, 转至PVDF膜, 于5%脱脂牛奶中封闭1 h, TBST洗涤3次, 每次10 min; 加入一抗, 室温孵育2 h, TBST洗涤3次; 加入二抗, 室温孵育1 h, TBST洗涤3次。加入ECL化学发光试剂显影并成像, 利用Image J软件分析条带灰度值。

## 2.7 统计学分析

利用Design Expert 13软件对响应面试验设计和结果进行分析。使用GraphPad Prism 10.0软件对数据进行统计学分析, 计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用单因素方差分析对多组间进行比较, 组间两两比较用t检验。

### 3 结果

#### 3.1 不同提取工艺的单因素考察

##### 3.1.1 热水提取法和反复冻融法单因素实验结果

考察热水提取温度对 SPP 提取率的影响, 结果如图 1-A 所示, 在提取温度为 20、40、60、80 °C 时, 提取率分别为 (7.74±0.08)%、(8.44±0.09)%、(8.53±0.05)%、(6.88±0.08)%; 热水提取温度为 60 °C

时, 多糖提取率最高。考察不同水浴时间对 SPP 提取率的影响, 结果如图 1-B 所示, 在水浴时间为 1、2、3、4、5 h 时, 提取率分别为 (1.15±0.08)%、(2.25±0.02)%、(5.10±0.10)%、(7.83±0.08)%、(6.62±0.11)%; 水浴时间为 4 h 时, 多糖提取率最高。考察冻融次数对 SPP 提取率的影响, 结果如图 1-C 所示, 冻融次数为 0、1、2、3 次时, 提取率分

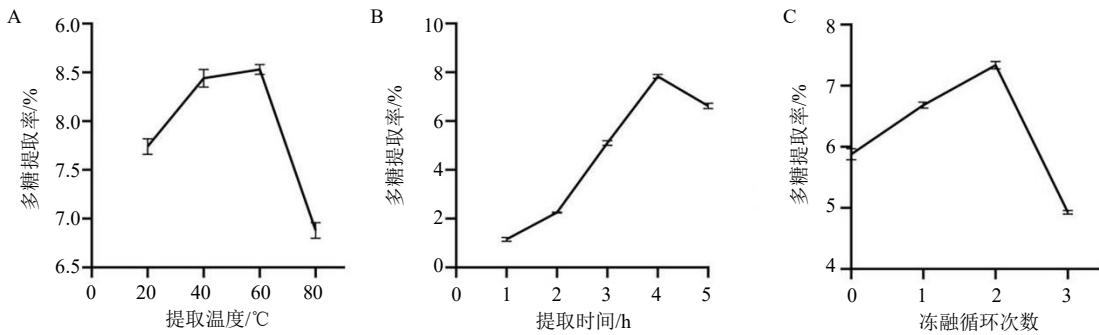


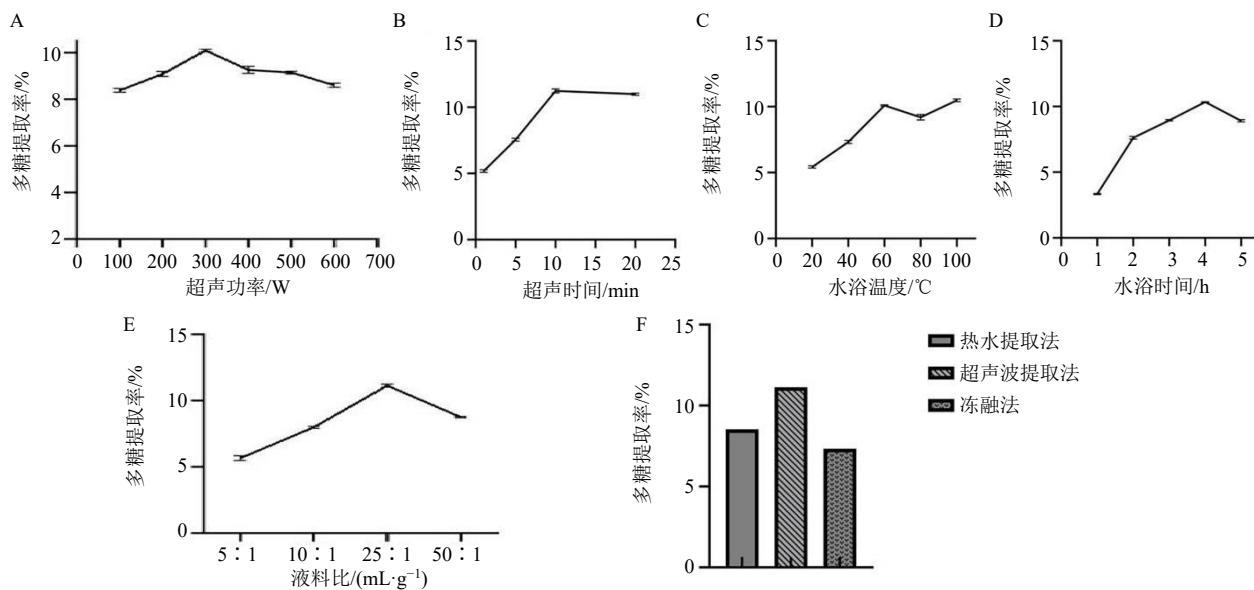
图 1 提取温度 (A)、提取时间 (B) 和冻融循环 (C) 对 SPP 提取率的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Fig. 1 Effect of extraction temperature (A), extraction time (B) and freeze-thaw cycles (C) on extraction rate of SPP ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

别为 (5.87±0.09)%、(6.68±0.05)%、(7.33±0.06)%、(4.92±0.03)%; 冻融 2 次时, 多糖提取率最高; 冻融 3 次时, 多糖提取率降低, 其原因可能为随着冻融次数的增加, 细胞破壁更加充分, 提取率提高, 但冻融次数过多会导致多糖分子本身损

伤, 导致多糖链断裂, 提取率降低<sup>[22]</sup>。

3.1.2 超声辅助提取法单因素实验结果 考察超声功率对 SPP 提取率的影响, 结果如图 2-A 所示, 在超声功率为 100、200、300、400、500、600 W 时, SPP 提取率分别为 (8.38±0.04)%、(9.08±0.11)%、



A-超声功率; B-超声时间; C-水浴温度; D-水浴时间; E-液料比; F-3 种提取方法对 SPP 提取率的影响。

A-ultrasound frequency; B-ultrasound time; C-water bath temperature; D-water bath time; E-liquid to material ratio; F-effect of three extraction methods on extraction rate of SPP.

图 2 不同条件和提取方法对 SPP 提取率的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Fig. 2 Effect of different conditions and extraction methods on extraction rate of SPP ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

( $10.09 \pm 0.05$ )%、( $9.26 \pm 0.15$ )%、( $9.14 \pm 0.06$ )%、( $8.60 \pm 0.09$ )%；超声功率为300 W时，多糖提取率最高。考察超声时间对SPP提取率的影响，结果如图2-B所示，超声时间为1、5、10、20 min时，SPP提取率分别为( $5.18 \pm 0.10$ )%、( $7.55 \pm 0.11$ )%、( $11.23 \pm 0.15$ )%、( $10.99 \pm 0.08$ )%；在超声时间为10 min时，提取率最高。考察水浴温度对SPP提取率的影响，结果如图2-C所示，水浴温度为20、40、60、80、100 ℃时，SPP提取率分别为( $5.42 \pm 0.08$ )%、( $7.32 \pm 0.12$ )%、( $10.09 \pm 0.05$ )%、( $9.20 \pm 0.21$ )%、( $10.48 \pm 0.10$ )%；水浴温度为100 ℃时，提取率最高，但从能源节约的角度选择60 ℃水浴温度。考察水浴时间对SPP提取率的影响，结果如图2-D所示，水浴时间为1、2、3、4、5 h时，SPP提取率分别为( $3.34 \pm 0.04$ )%、( $7.62 \pm 0.10$ )%、( $8.95 \pm 0.05$ )%、( $10.34 \pm 0.03$ )%、( $8.91 \pm 0.08$ )%；水浴时间为4 h，多糖提取率最高。考察液料比对SPP提取率的影响，结果如图2-E所示，液料比为5:1、10:1、25:1、50:1时，SPP提取率分别为( $5.66 \pm 0.18$ )%、( $7.98 \pm 0.08$ )%、( $11.13 \pm 0.11$ )%、( $8.76 \pm 0.05$ )%；液料比为25:1时，多糖提取率最高。

综上，对于SPP的提取，传统热水提取法的最佳工艺条件是样品液料比25:1，热水浴60 ℃浸提4 h；超声波辅助提取法的最佳工艺条件是样品液料比25:1，超声波300 W处理10 min；反复冻融法的最佳工艺条件是样品液料比25:1，反复冻融2次。对比上述3种方法，超声辅助提取法提取的SPP提取率最高（图2-F）。

**3.1.3 超声辅助提取响应面试验** 试验设计与结果见表2。由表3可知，模型的P值<0.000 1，说明模型极显著；失拟项P值=0.426 2>0.05，表明失拟项不显著，方程的拟合度较好，方程成立，因此可以用此模型对SPP的提取率(Y)进行分析和预测。得到自变量与SPP含量的二次多项回归方程为 $Y=10.55+1.36A+0.410 0B+0.591 2C-0.590 9AB+0.220 0AC+0.349 8BC-1.58A^2-1.07B^2-1.70C^2$ 。A、B、C、交互项AB及3个平方项(A<sup>2</sup>、B<sup>2</sup>、C<sup>2</sup>)极显著影响SPP提取率( $P<0.01$ )，其他项不显著。

由方差分析结果可知，各因素对SPP提取率的影响关系为超声时间>液料比>超声功率。由图3-A可知，固定超声功率下，随超声时间增加，SPP提取率曲线呈先增加、后趋于平缓的趋势。超声功率和超声时间之间存在极显著的交互作用。图3-B

表2 响应面分析的试验设计和结果

Table 2 Experimental design and results of response surface analysis

编号	A	B	C	多糖提取率/%
1	-1	-1	0	5.63
2	1	-1	0	9.13
3	-1	1	0	7.78
4	1	1	0	9.05
5	-1	0	-1	5.20
6	1	0	-1	8.05
7	-1	0	1	5.78
8	1	0	1	9.51
9	0	-1	-1	7.22
10	0	1	-1	7.13
11	0	-1	1	7.73
12	0	1	1	9.03
13	0	0	0	10.51
14	0	0	0	10.78
15	0	0	0	10.58
16	0	0	0	10.23
17	0	0	0	10.01

表3 回归模型的方差分析

Table 3 Analysis of variance of regression model

方差来源	平方和	自由度	均方	F值	P值
模型	51.43	9	5.71	58.05	<0.000 1
A	14.50	1	14.50	147.37	<0.000 1
B	1.34	1	1.34	13.66	0.007 7
C	2.74	1	2.74	27.87	0.001 1
AB	1.42	1	1.42	14.48	0.006 7
AC	0.193 6	1	0.193 6	1.97	0.203 5
BC	0.499 1	1	0.499 1	5.07	0.059 0
A <sup>2</sup>	10.56	1	10.56	107.27	<0.000 1
B <sup>2</sup>	4.32	1	4.32	43.85	0.000 3
C <sup>2</sup>	12.22	1	12.22	124.14	<0.000 1
残差	0.689 0	7	0.098 4		
失拟项	0.321 5	3	0.107 2	1.17	0.426 2
纯误差	0.367 5	4	0.091 9		
总误差	52.11	16			
R <sup>2</sup>	0.986 8				
R <sup>2</sup> <sub>adj</sub>	0.969 8				

显示SPP提取率随超声时间和液料比的变化而发生系统性改变。图3-C描述了不同超声功率和液料比下SPP提取率的变化趋势。通过该模型的预测，SPP最佳提取工艺参数为超声时间12.55 min、超声功率314.928 W、液料比26.746:1，多糖提取率为10.845%。

根据以上试验的响应面分析得到SPP超声辅助提取的最优提取工艺条件，即超声时间10 min超声功率300 W、液料比25:1进行实验，平行5组实验，得到SPP提取率为( $10.42 \pm 0.30$ )%，与模型预测基本一致。

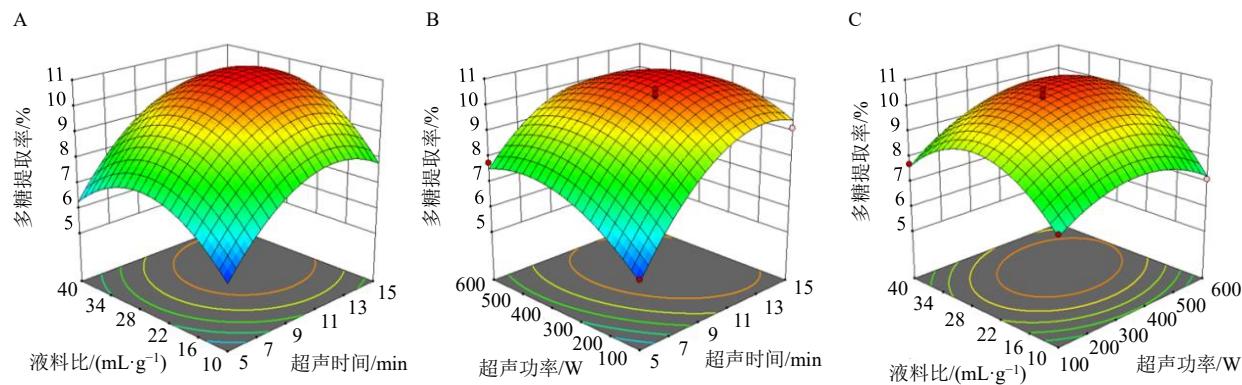


图3 超声时间和超声功率 (A)、超声时间和液料比 (B)、超声功率和液料比 (C) 对 SPP 提取率的影响

Fig. 3 Effect of ultrasound time and ultrasound power (A), ultrasound time and liquid to material ratio (B), ultrasonic power and liquid to material ratio (C) on extraction rate of SPP

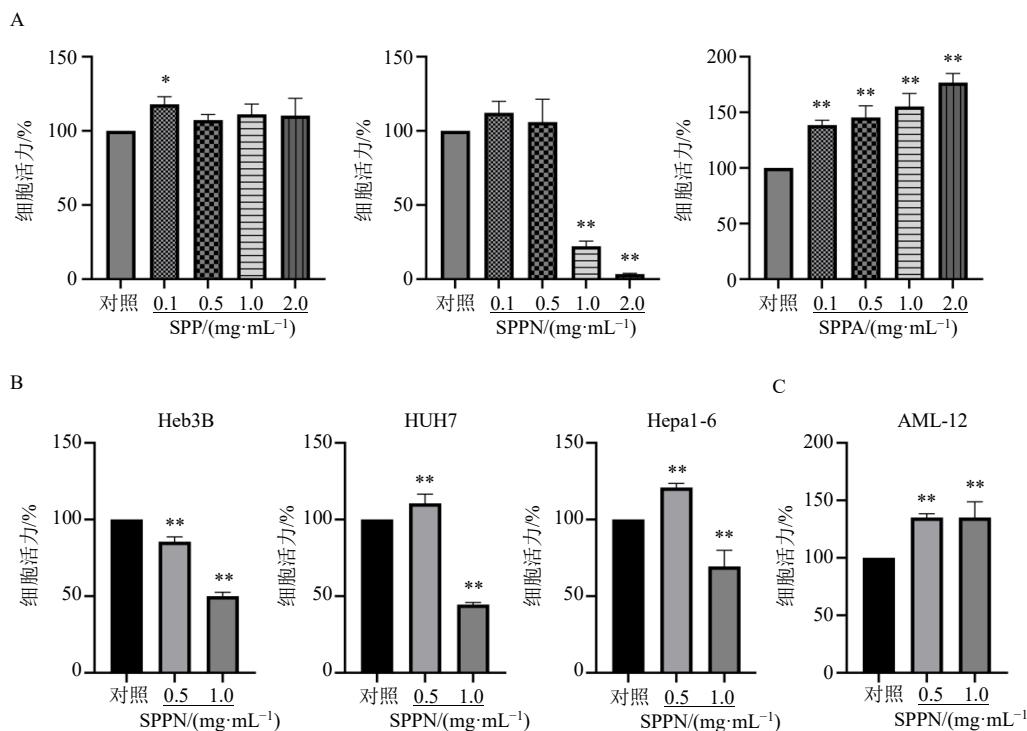
### 3.2 SPPN 抑制 HCC 细胞增殖

**3.2.1 SPP 及其各多糖级分对 HepG2 细胞活力的影响** 如图 4-A 所示, 0.1 mg/mL 的 SPP 显著促进 HepG2 细胞增殖 ( $P<0.05$ ), 0.5~2.0 mg/mL 的 SPP 对 HepG2 细胞活力无明显影响。0.1~2.0 mg/mL SPPA 显著促进 HepG2 细胞增殖 ( $P<0.01$ ), 且呈剂量相关性。1.0、2.0 mg/mL 的 SPPN 显著抑制 HepG2 增殖 ( $P<0.01$ ), 在 2 mg/mL 质量浓度下抑制率达 90%。选择 0.5、1.0 mg/mL 的 SPPN 进行后续实验。

量相关性。1.0、2.0 mg/mL 的 SPPN 显著抑制 HepG2

增殖 ( $P<0.01$ ), 在 2 mg/mL 质量浓度下抑制率达 90%。选择 0.5、1.0 mg/mL 的 SPPN 进行后续实验。

**3.2.2 SPPN 对肝癌细胞及小鼠正常肝细胞活力的影响** 如图 4-B、C 所示, 1.0 mg/mL SPPN 显著抑制 Hep3B、HUH7、Hepa1-6 细胞增殖 ( $P<0.01$ ),



A-不同质量浓度的 SPP、SPPN、SPPA 对 HepG2 细胞活力的影响; B-不同质量浓度的 SPPN 对肝癌细胞 Hep3B、HUH7 和 Hepa1-6 活力的影响; C-不同质量浓度的 SPPN 对正常小鼠肝细胞 AML-12 活力的影响; 与对照组比较: \* $P<0.05$  \*\* $P<0.01$ 。

A-effect of different concentrations of SPP, SPPN and SPPA on viability of HepG2 cells; B-effect of different concentrations of SPPN on viability of liver cancer cell lines Hep3B, HUH7 and Hepa1-6; C-effect of different concentrations of SPPN on viability of normal mouse liver cells AML-12; \* $P<0.05$

\*\* $P<0.01$  vs control group.

图4 SPP 及其各多糖级分对细胞活力的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Fig. 4 Effects of SPPN and its various polysaccharide fractions on cell viability ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

但对小鼠正常肝细胞 AML-12 具有显著的促增殖作用 ( $P<0.01$ )。

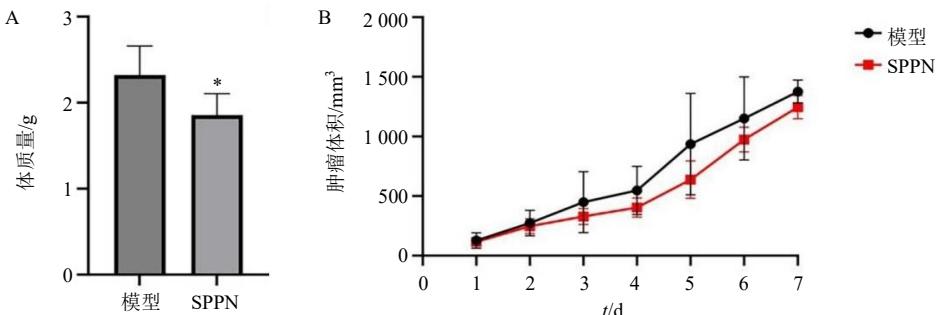
### 3.3 SPPN 抑制 Hepa1-6 肝癌荷瘤小鼠肿瘤生长

如图 5 所示, Hepa1-6 肝癌荷瘤小鼠给予 SPPN 干预后, 肿瘤质量显著降低 ( $P<0.05$ ), 肿瘤体积

增长减慢, 瘤体变小。表明 SPPN 对 Hepa1-6 肝癌荷瘤小鼠的肿瘤生长具有一定的抑制作用。

### 3.4 SPPN 显著改变 HepG2 细胞各修饰蛋白表达水平

如图 6 所示, SPP、SPPN 处理 HepG2 细胞后,

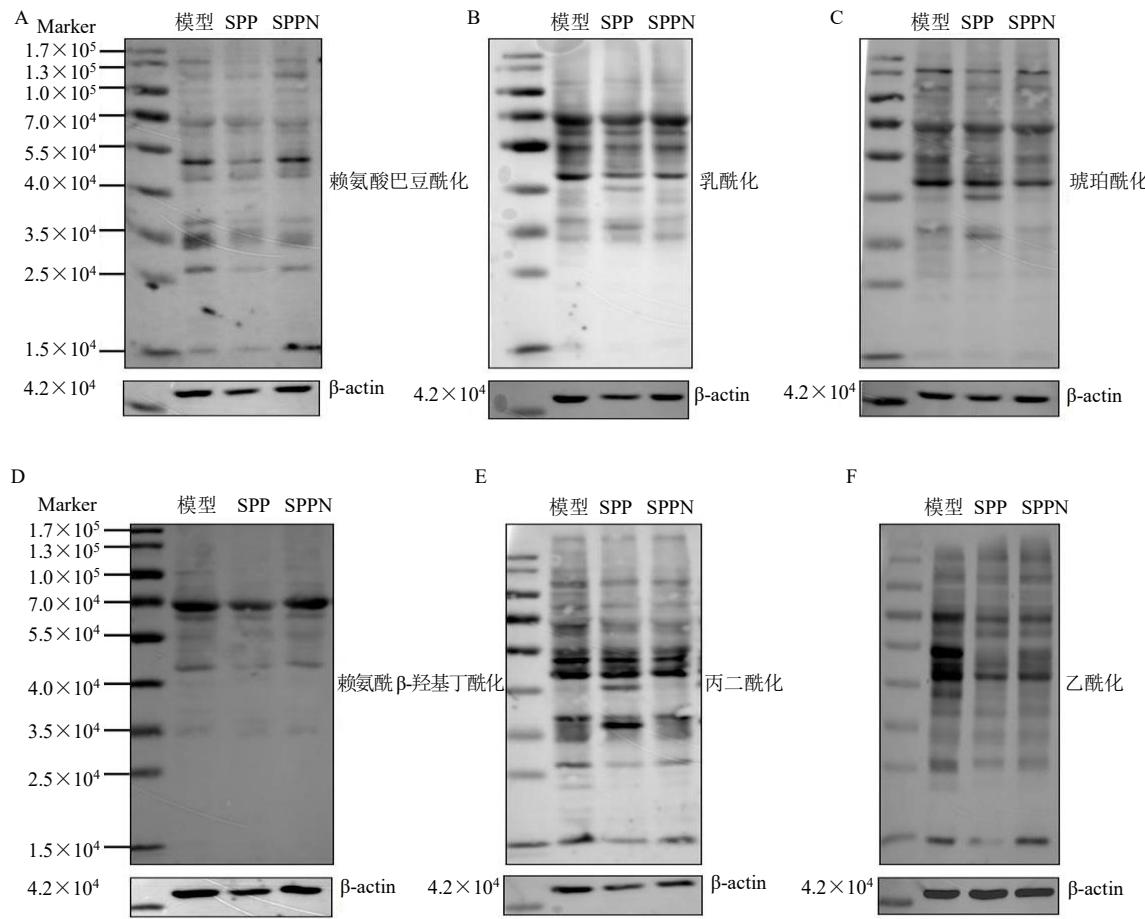


与模型组比较: \* $P<0.05$ 。

\* $P<0.05$  vs model group.

图 5 SPPN 对 Hepa1-6 肝癌荷瘤小鼠肿瘤质量 (A) 和肿瘤体积 (B) 的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=5$ )

Fig. 5 Effect of SPPN on tumor weight (A) and tumor volume (B) of Hepa1-6 liver cancer bearing mice ( $\bar{x} \pm s, n=5$ )



A-赖氨酸巴豆酰化; B-乳酰化; C-琥珀酰化; D-赖氨酸β-羟基丁酰化; E-丙二酰化; F-乙酰化。

A-lysine crotonylation; B-lactylation; C-succinylation; D-lysine β-hydroxybutyrylation; E-malonylation; F-acetylation.

图 6 SPP 和 SPPN 对 HepG2 细胞中各种修饰蛋白表达的影响 ( $n=3$ )

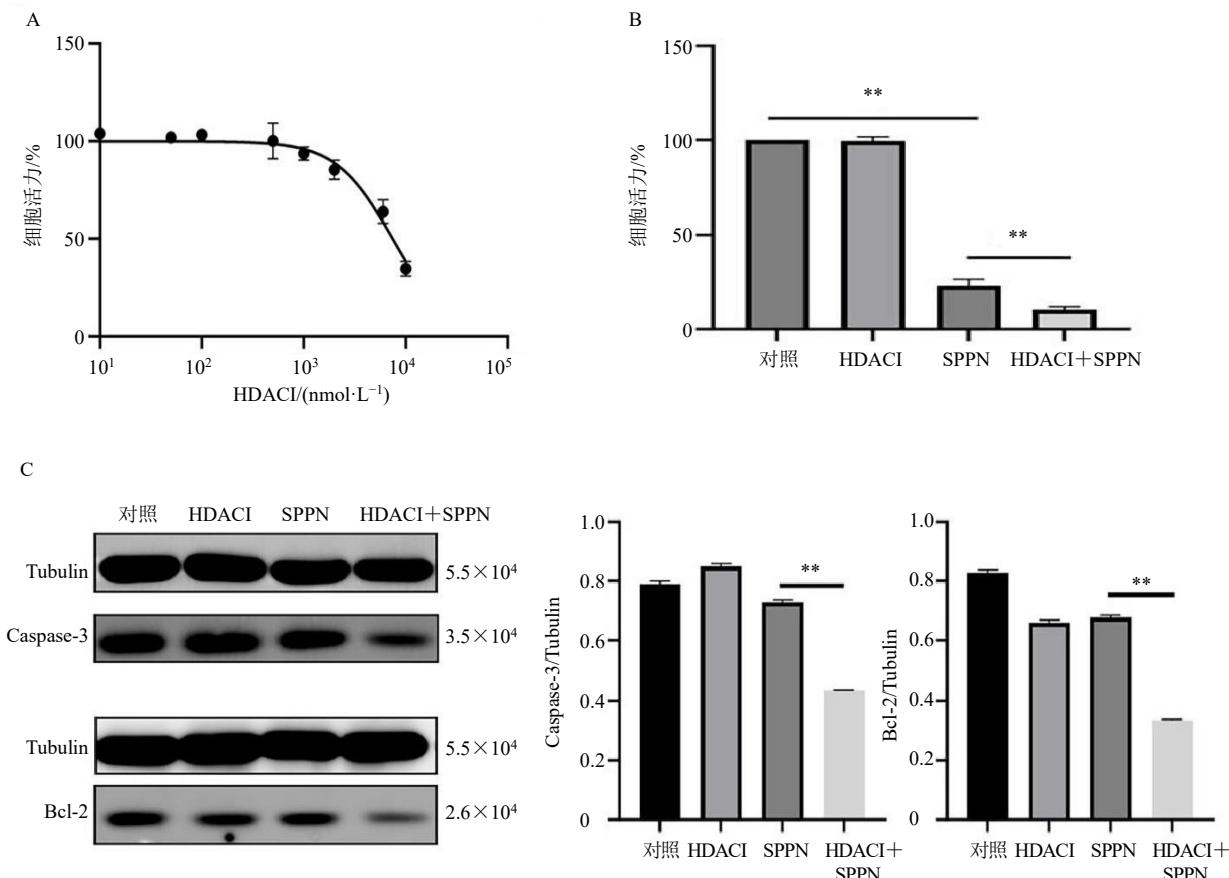
Fig. 6 Effect of SPP and SPPN on expressions of various modified proteins in HepG2 cells ( $n=3$ )

细胞内部分蛋白的巴豆酰化、乳酸化、琥珀酰化、赖氨酸 3-羟基丁酰化、丙二酰化水平改变, 细胞内蛋白乙酰化水平整体降低。

### 3.5 HDACI 可增强 SPPN 对 HepG2 细胞的杀伤作用

用不同浓度的 HDACI 处理 HepG2 细胞, 绘制剂量效应曲线, 发现 HDACI 对 HepG2 细胞活力无明显影响的最大浓度为  $1 \mu\text{mol/L}$  (图 7-A), 故选择

$1 \mu\text{mol/L}$  HDACI 进行后续实验。如图 7-B 所示,  $1 \text{ mg/mL}$  SPPN 单独处理 HepG2 细胞时, 显著抑制 HepG2 细胞增殖 ( $P < 0.01$ ); 与 HDACI 联用后, 显著增加了 SPPN 对 HepG2 细胞增殖的抑制作用 ( $P < 0.01$ )。如图 7-C 所示, 与 SPPN 单独处理相比, HDACI 与 SPPN 联合处理 HepG2 细胞时, Caspase-3 和 Bcl-2 蛋白表达水平显著降低 ( $P < 0.01$ )。表明 SPPN 可与 HDACI 协同促进 HepG2 细胞凋亡。



A-不同浓度的 HDACI 对 HepG2 活力的影响; B-HDACI 和 SPPN 对 HepG2 细胞活力的作用; C-HDACI 和 SPPN 对 HepG2 细胞 Caspase-3 和 Bcl-2 蛋白表达的影响; \*\* $P < 0.01$ 。

A-effect of different concentrations of HDACI on viability of HepG2 cells; B-effect of HDACI and SPPN on viability of HepG2 cells; C-effect of HDACI and SPPN on Caspase-3 and Bcl-2 protein expressions in HepG2 cells; \*\* $P < 0.01$ .

图 7 HDACI 和 SPPN 对 HepG2 细胞的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Fig. 7 Effect of HDACI and SPPN on HepG2 cells ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

## 4 讨论

利用响应面试验优化超声辅助提取 SPP 工艺, 得到最佳提取条件为超声时间 10 min、超声功率 300 W、液料比 25 : 1, SPP 提取率为 (10.42  $\pm$  0.30) %。相较于传统提取法, 优化后的超声提取法具有迅速、节能、操作简便、提取率高等优点。研究发现, SPP 具有显著的抗肿瘤作用。SPP 能够显

著抑制人宫颈癌 HeLa 细胞、人胃癌 MGC 细胞、人乳腺癌 MB-231 细胞、人结肠癌 HT-29 细胞增殖<sup>[23-26]</sup>。本研究利用 SPP 及其各多糖级分处理 HCC 细胞, 发现  $1 \text{ mg/mL}$  SPPN 可显著抑制 HCC 细胞增殖, 同时对小鼠正常肝细胞 AML-12 具有促增殖作用。在 Hepa1-6 肝癌荷瘤小鼠模型中, SPPN 显著抑制荷瘤小鼠的肿瘤生长。提示 SPPN 可作为治疗

HCC 的潜在药物。

HCC 的恶化与 PTMs 等表观遗传调控机制密切相关。敲除 HDAC1 和 HDAC3 后发现巴豆酰化能够抑制 HCC 的进展<sup>[27]</sup>。Yuan 等<sup>[28]</sup>发现在琥珀酰化位点蛋白质精氨酸甲基转移酶 5 (protein arginine methyltransferase 5, PRMT5) 上, 通过 SIRT7 介导的 K387 去羧化作用促进了脂质代谢重编程、肿瘤生长和转移。Pan 等<sup>[29]</sup>发现三萜类抗肿瘤化合物去甲泽拉木醛可通过降低 H3K9la 和 H3K56la 水平, 抑制肝癌干细胞 (liver cancer stem cells, LCSCs) 的增殖从而抑制 HCC 进展, 且组蛋白 H3 乳酸化水平与预后呈正相关。本研究发现 SPPN 处理后的 HepG2 细胞内部分蛋白的巴豆酰化、乳酸化、琥珀酰化、赖氨酸 3-羟基丁酰化、丙二酰化水平改变, 细胞内蛋白乙酰化水平整体降低。提示 SPPN 抑制 HCC 细胞增殖可能与调节 HCC 细胞的 PTMs 相关。

乙酰化主要发生在赖氨酸残基上, 受 HDAC 和组蛋白乙酰转移酶 (histone acetyltransferase 1, HAT) 调控。磷酸甘油激酶 1 (phosphoglycerate kinase 1, PGK1) 是代谢性糖酵解途径中的重要酶, PGK1 K323 位点的乙酰化能促进其酶活性升高和癌细胞代谢, 肝癌组织中 PGK1 明显过表达, PGK1 的缺失显著降低了癌细胞的增殖和肿瘤发生<sup>[30]</sup>。肝癌中高表达的组蛋白乙酰转移酶 hMOF 通过影响染色质重塑促进肝癌的血管浸润<sup>[31]</sup>; 组蛋白乙酰转移酶 HAT1 在肝癌中异常高表达, 促进肝癌细胞的糖酵解进而促进肝癌的发生<sup>[32]</sup>。乙型肝炎病毒 (hepatitis B virus, HBV) 通过调控 Delta 样配体 3 (Delta-like ligand 3, DLL3) 启动子组蛋白乙酰化参与肝癌的发生发展过程<sup>[33]</sup>。本研究发现, HDAC1 与 SPPN 联合处理 HCC 细胞时, 可显著增加 SPPN 对 HCC 细胞增殖的抑制作用并显著下调 Caspase-3 及 Bcl-2 蛋白表达水平。推测 SPPN 可能通过下调 HCC 细胞内 PGK1 等蛋白乙酰化水平或抑制 hMOF 的表达, 从而抑制 HCC 细胞增殖。同时, HDAC1 使组蛋白 (H3/H4) 乙酰化水平 (如 H3K9ac、H4K16ac) 升高, 激活被沉默的抑癌基因 (如 PTEN、E-cadherin), 两者协同作用进一步抑制 HCC 细胞增殖, 后续将开展实验进一步验证。本研究将 SPP 与乙酰化修饰相结合, 对 HCC 的发生及预后提供了新颖的研究方法, 并为 SPP 调节 HCC 的 PTMs 方面延伸了更多可能, 对未来 HCC 治疗提供理论指导和实验依据。

**利益冲突** 所有作者均声明不存在利益冲突

## 参考文献

- 柳卓, 田雪飞, 曾普华. 肝癌中蛋白质翻译后修饰的研究进展 [J]. 中国药理学通报, 2022, 38(6): 828-831.
- 侯天云, 陆小鹏, 朱卫国. 蛋白质翻译后修饰在蛋白质-蛋白质相互作用中的调控作用 [J]. 科学通报, 2017, 62(8): 759-769.
- Shvedunova M, Akhtar A. Modulation of cellular processes by histone and non-histone protein acetylation [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2022, 23(5): 329-349.
- Sankar A, Mohammad F, Sundaramurthy A K, et al. Histone editing elucidates the functional roles of H3K27 methylation and acetylation in mammals [J]. *Nat Genet*, 2022, 54(6): 754-760.
- Wu Y, Li M, Yang M. Post-translational modifications in oocyte maturation and embryo development [J]. *Front Cell Dev Biol*, 2021, 9: 645318.
- Fu Y D, Yu J, Li F, et al. Oncometabolites drive tumorigenesis by enhancing protein acylation: From chromosomal remodelling to nonhistone modification [J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2022, 41(1): 144.
- Lin Y Y, Qiu T, Wei G F, et al. Role of histone post-translational modifications in inflammatory diseases [J]. *Front Immunol*, 2022, 13: 852272.
- Li Y H, Zhong M, Zang H L, et al. MTA1 promotes hepatocellular carcinoma progression by downregulation of DNA-PK-mediated H1.2<sup>T146</sup> phosphorylation [J]. *Front Oncol*, 2020, 10: 567.
- Wu H, Yang T Y, Li Y, et al. Tumor necrosis factor receptor-associated factor 6 promotes hepatocarcinogenesis by interacting with histone deacetylase 3 to enhance c-myc gene expression and protein stability [J]. *Hepatology*, 2020, 71(1): 148-163.
- Hamidi M, Mohammadi A, Mashhadi H, et al. Evaluation of effective environmental parameters on lipid, protein and beta-carotene production in *Spirulina platensis* microalga [J]. *Results Eng*, 2023, 18: 101102.
- 王皓南, 范晶, 余坤子, 等. 霍山石斛多糖的结构分析、生物活性研究进展及与不同种间多糖成分差异性分析 [J]. 中草药, 2023, 54(15): 5044-5056.
- 刘宇, 戴沅霖, 马越, 等. 金银花粗多糖提取工艺优化及其抗氧化活性评价 [J]. 食品工业科技, 2023, 44(7): 188-196.
- 侯兆乾, 刘鑫阳, 史超, 等. 冻融法和超声破碎法提取螺旋藻中藻蓝蛋白的工艺研究 [J]. 内蒙古农业大学学报: 自然科学版, 2017, 38(2): 69-75.
- Mo M M, Chen W M, Jiang F Y, et al. Effect of ultrasonic treatment on structure, antibacterial activity of sugarcane leaf polysaccharides [J]. *Chem Biodivers*, 2023, 20(9):

- e202300006.
- [15] Khatua S, Acharya K. Antioxidation and immune-stimulatory actions of cold alkali extracted polysaccharide fraction from *Macrocybe lobayensis*, a wild edible mushroom [J]. *3 Biotech*, 2022, 12(10): 247.
- [16] Gu H F, Liang L, Zhu X P, et al. Optimization of enzymatic extraction, characterization and bioactivities of Se-polysaccharides from Se-enriched *Lentinus edodes* [J]. *Food Biosci*, 2023, 51: 102346.
- [17] Ai X P, Yu P L, Li X Y, et al. Polysaccharides from *Spirulina platensis*: Extraction methods, structural features and bioactivities diversity [J]. *Int J Biol Macromol*, 2023, 231: 123211.
- [18] 罗光宏, 王海蓉, 崔晶, 等. 微波辅助低共熔溶剂提取、部分纯化螺旋藻多糖及其体外生物学活性研究 [J]. 食品与发酵工业, 2022, 48(11): 107-113.
- [19] 张敬, 董梁, 刘彦玲. 螺旋藻多糖对脂多糖诱导小鼠急性肝损伤的保护作用 [J]. 中成药, 2022, 44(10): 3333-3337.
- [20] 张志娟, 乔明霞, 郝言芝, 等. 复合螺旋藻多糖对人肝癌 7402 细胞的抑制作用 [J]. 陕西医学杂志, 2009, 38(3): 279-281.
- [21] Zhang J, Xue H, Yan S, et al. Phylogenetic analysis of *Arthrospira* strains from Ordos based on 16S rRNA [J]. *Sci Rep*, 2022, 12(1): 14375.
- [22] 施伟梅, 张颖豪, 邓龙华, 等. 超声波-超低温冻融法提取紫花苜蓿多糖的工艺优化 [J]. 粮食与油脂, 2019, 32(4): 85-89.
- [23] 郝言芝, 张志娟, 乔明霞, 等. 复合螺旋藻多糖对人宫颈癌 HeLa 细胞的抑制作用 [J]. 安徽农业科学, 2009, 37(8): 3367-3368.
- [24] 乔明霞, 于蕾妍, 郝言芝, 等. 复合螺旋藻多糖对人胃癌 MGC 细胞的抑制作用 [J]. 时珍国医国药, 2009, 20(6): 1385-1386.
- [25] 徐小娟, 张勇, 唐超, 等. 复合螺旋藻多糖对人乳腺癌 MB-231 细胞株体外抗肿瘤作用研究 [J]. 辽宁中医药大学学报, 2012, 14(10): 70-72.
- [26] 徐小娟, 张勇, 唐超, 等. 复合螺旋藻多糖对人结肠癌 HT-29 细胞株体外抗肿瘤作用的研究 [J]. 时珍国医国药, 2012, 23(9): 2164-2166.
- [27] Wan J H, Liu H Y, Ming L. Lysine crotonylation is involved in hepatocellular carcinoma progression [J]. *Biomed Pharmacother*, 2019, 111: 976-982.
- [28] Yuan H F, Zhao M, Zhao L N, et al. PRMT5 confers lipid metabolism reprogramming, tumour growth and metastasis depending on the SIRT7-mediated desuccinylation of PRMT5 K387 in tumours [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2022, 43(9): 2373-2385.
- [29] Pan L H, Feng F, Wu J Q, et al. Demethylzeylasterol targets lactate by inhibiting histone lactylation to suppress the tumorigenicity of liver cancer stem cells [J]. *Pharmacol Res*, 2022, 181: 106270.
- [30] Hu H L, Zhu W W, Qin J, et al. Acetylation of PGK1 promotes liver cancer cell proliferation and tumorigenesis [J]. *Hepatology*, 2017, 65(2): 515-528.
- [31] Poté N, Cros J, Laouirem S, et al. The histone acetyltransferase hMOF promotes vascular invasion in hepatocellular carcinoma [J]. *Liver Int*, 2020, 40(4): 956-967.
- [32] Jin X, Tian S H, Li P P. Histone acetyltransferase 1 promotes cell proliferation and induces cisplatin resistance in hepatocellular carcinoma [J]. *Oncol Res*, 2017, 25(6): 939-946.
- [33] Hamamoto H, Maemura K, Matsuo K, et al. Delta-like 3 is silenced by HBx via histone acetylation in HBV-associated HCCs [J]. *Sci Rep*, 2018, 8(1): 4842.

[责任编辑 李亚楠]