·论著·一次研究·

miR-222-3p对口腔鳞状细胞癌CAL-27细胞增殖、凋亡和侵袭的影响

杨淑银，岳二丽，郭留云，陆　珂，杨梦宇

郑州大学第一附属医院牙周科（郑州 450000）

【摘要】**目的** 探讨微小 RNA-222-3p（miR-222-3p）对口腔鳞状细胞癌 CAL-27 细胞增殖、凋亡和侵袭的影响。**方法** 采用 qRT-PCR 检测口腔鳞状细胞癌 CAL-27 细胞和正常口腔角质细胞株（hNOK）中 miR-222-3p 的表达，培养 CAL-27 细胞并分为对照组（NC 组）、inhibitor NC 组（转染阴性对照质粒）和 miR-222-3p inhibitor 组（转染 miR-222-3p inhibitor）。分别采用 MTT 法、流式细胞术及 Trasnwell 法检测细胞增殖、凋亡及侵袭能力变化，蛋白质印迹法检测 BAX、Bcl-2、MMP-2、N-cadherin 及 E-cadherin 的表达。**结果** CAL-27 细胞中 miR-222-3p 的表达水平显著高于 hNOK 细胞（$P < 0.05$）。与 inhibitor NC 组和 NC 组相比，miR-222-3p inhibitor 组 CAL-27 细胞的凋亡率显著升高，增殖、侵袭能力显著降低（$P < 0.05$），且 Bcl-2、MMP-2 和 N-cadherin 蛋白表达水平显著降低，BAX 和 E-cadherin 蛋白表达水平显著升高（$P < 0.05$）。**结论** miR-222-3p 在 CAL-27 细胞中高表达，下调 miR-222-3p 可抑制 CAL-27 细胞的增殖和侵袭能力，并促进细胞凋亡。

【关键词】口腔鳞状细胞癌；微小 RNA -222-3p；CAL-27 细胞；增殖；凋亡；侵袭

Effects of miR-222-3p on proliferation, apoptosis and invasion of oral squamous cell carcinoma CAL-27 cells

Shu-Yin YANG, Er-Li YUE, Liu-Yun GUO, Ke LU, Meng-Yu YANG

Department of Periodontics, The First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450000, China

Corresponding author: Liu-Yun GUO, Email: gyylys@126.com

【Abstract】**Objective** To investigate the effects of micro RNA-222-3p (miR-222-3p) on the proliferation, apoptosis and invasion of oral squamous cell carcinoma (OSCC) CAL-27 cells. **Methods** qRT-PCR was used to detect the expression of miR-222-3p in CAL-27 cells and normal oral keratinocyte cell line (hNOK). CAL-27 cells were cultured and divided into control group (NC group), inhibitor NC group (transfected negative control plasmid) and miR-222-3p inhibitor group (transfected into miR-222-3p inhibitor). MTT, flow cytometry and Trasnwell method were used to detect the changes of cell proliferation, apoptosis and invasion ability, respectively, and Western Blot was used to detect the expression of BAX, Bcl-2, MMP-2, N-cadherin and E-cadherin. **Results** The expression of miR-222-3p in CAL-27

DOI: 10.12173/j.issn.1004-5511.202302031

基金项目：河南省高等学校重点科研项目计划（20B320053）

通信作者：郭留云，主任医师，副教授，Email：gyylys@126.com

cells was significantly higher than that of hNOK cells (P<0.05). Compared with inhibitor NC group and NC group, the apoptosis rate was significantly increased, and the proliferation and invasion ability of CAL-27 cells was significantly decreased (P<0.05), the expression levels of Bcl-2, MMP-2 and N-cadherin were significantly decreased, while the expression levels of BAX and E-cadherin were significantly increased in miR-222-3p inhibitor group (P<0.05). **Conclusion** miR-222-3p is highly expressed in CAL-27 cells, and down-regulation of miR-222-3p can inhibit the proliferation and invasion of CAL-27 cells, and promote cell apoptosis

【Keywords】Oral squamous cell carcinoma; Micro RNA-222-3p; CAL-27 cell; Proliferation; Apoptosis; Invasion

口腔鳞状细胞癌（oral squamous cell carcinoma，OSCC）是口腔颌面部常见的恶性肿瘤之一，易发生头部或颈部淋巴结转移，严重影响患者预后和生存[1-2]。因此探讨 OSCC 发生发展的分子机制对寻找 OSCC 治疗靶点以及改善 OSCC 患者预后具有重要意义。微小 RNA（miRNA，miR）是一类内源性单链非编码小分子 RNA，可通过调节其下游靶基因的表达参与细胞增殖、分化和凋亡等多种生物学过程，与多种肿瘤的发生发展、预后密切相关[3-4]。近年研究显示，miR-222-3p 在宫颈癌[5]、非小细胞肺癌[6]及甲状腺癌[7]等多种恶性肿瘤组织中异常表达，并与患者预后密切相关。已有证据显示，miR-222-3p 在 OSCC 患者外周血中高表达，且与 TNM 分期和淋巴结转移及生存期密切相关。但 miR-222-3p 在 OSCC 中的作用机制尚未明确，本研究通过分析 miR-222-3p 对人 OSCC CAL-27 细胞增殖、凋亡及侵袭的影响，初步探讨其对 OSCC 生物学行为的影响，为 OSCC 的治疗提供新的思路。

1 材料与方法

1.1 细胞及主要试剂

人 OSCC CAL-27 细胞株及人正常口腔角质细胞株（hNOK）均购自北京北纳创联生物技术研究院。RPMI-1640 培养基、胎牛血清、0.25% 胰蛋白酶、Trizol 试剂、脂质体 lipofectamine 2000 购自美国 Invitrogen 公司；反转录试剂盒和 SYBR Green 荧光定量试剂盒购自日本 TaKaRa 公司；甲基噻唑基四唑（methyl thiazolyl tetrazolium，MTT）试剂盒（M-0283）购自美国 Sigma 公司；BAX（ab32503）、Bcl-2（ab32124）、MMP-2（ab92536）、N-cadherin（ab76011）、E-cadherin（ab40772）及 β-actin（ab8226）抗体购自英国 Abcam 公司。

1.2 细胞培养及转染

CAL-27 和 hNOK 细胞培养于含 10% 胎牛血清、100 U/mL 青霉素和 100 mg/mL 链霉素的 RPMI-1640 培养基，置于 37℃、5%CO_2 的培养箱中。实验分为对照组（NC 组）、inhibitor NC 组和 miR-222-3p inhibitor 组。将对数生长期的 CAL-27 细胞接种到 96 孔板（1×10^4/ 孔）中，待细胞融合度达到 70% 左右按照 liporfectamine 2000 转染试剂说明书分别将 miR-222-3p inhibitor 和阴性对照质粒（inhibitor NC）转染至细胞，转染 48 h 后进行后续实验。

1.3 实时荧光定量PCR（qRT-PCR）

采用 RNA 提取试剂盒提取各组细胞的总 RNA，并逆转录合成 cDNA，然后使用 qRT-PCR 仪（美国 ABI）进行 qRT-PCR 检测。引物序列：miR-222-3p 上游 5'-AGCTACATCT GGCTACTGGGT-3'，下游 5'-GCGAGCACAGAA TTAATACGA C-3'；U6 上游 5'-CTCGCT TCGGCAGCACA-3'，下游 5'-AACGCTTCACGAATTTGCGT-3'。反应条件：95 ℃预变性 15 s，95 ℃ 10 s，60 ℃ 20 s，72 ℃ 30 s，40 个循环。以 U6 为内参，采用 $2^{-\triangle\triangle Ct}$ 法计算细胞中 miR-222-3p 的相对表达水平。

1.4 MTT法检测细胞增殖能力

将 CAL-27 细胞接种至 96 孔板中，分别培养 24，48，72 和 96 h 后，每孔加入 20 μL MTT 试剂，继续培养 4 h，弃上清加入 150 μL DMSO 振荡充分溶解，于酶标仪上检测波长在 570 nm 处测吸光值（OD），检测各组细胞的增殖情况。

1.5 流式细胞术检测细胞凋亡

利用 Annexin-V 和碘化丙啶（PI）凋亡检测

试剂盒（美国 Sigma-Aldrich）检测细胞凋亡。将转染 48 h 的 CAL-27 细胞消化后，重悬于结合缓冲液中，混匀后加入 5 μL Annexin V（FITC），避光染色 10 min 后加入 50 mg/L PI 染色室温避光反应 5 min，采用流式细胞仪（美国 Becton Dickinson）检测细胞凋亡情况。

1.6 Transwell检测细胞侵袭

将转染后的细胞悬浮液 100 μL 加入小室的上室中，将 600 μL 含有 10%FBS 的 PRMI-1640 培养基或 100 μL 稀释后的 Matrigel 基质胶均匀加到下室中，37℃、5%CO_2 培养箱培养 24 h 后，用棉签擦去上室细胞，4% 多聚甲醛固定迁移到下室的细胞，0.1% 结晶紫染色，洗净晾干后，倒置于显微镜下随机选取 5 个视野进行计数。实验重复 3 次。

1.7 蛋白质印迹法检测蛋白表达水平

采用细胞总蛋白提取试剂盒提取总蛋白，BCA 法测定蛋白质浓度后进行 SDS-PAGE 电泳，转膜后用含 5% 脱脂奶粉室温封闭 1 h。加入 BAX、Bcl-2、MMP-2、N-cadherin、E-cadherin 及 β-actin（1∶1 000）一抗，4℃孵育过夜，洗膜后，加入 HRP 标记的羊抗兔或鼠的二抗 IgG（1∶2 000）。室温孵育 2 h 后，暗室中用 ECL 发光，并采用软件 Image J 进行图像分析。以 β-actin 为内参，计算目的蛋白的相对表达量。

1.8 统计学分析

采用 SPSS 19.0 软件对数据进行统计分析。本研究各项实验均重复 3 次，计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示，两组间比较采用独立样本 t 检验，多组间比较采用单因素方差分析，组间两两比较采用 LSD-t 检验；计数资料采用 χ^2 检验。$P < 0.05$ 代表差异有统计学意义。

2 结果

2.1 miR-222-3p在CAL-27细胞中的表达

CAL-27 细胞中 miR-222-3p 的表达水平显著高于hNOK细胞（4.63 ± 0.35 *vs*. 1.01 ± 0.21，$P < 0.001$）。

2.2 各组细胞miR-222-3p的表达

qRT-PCR 检测结果显示，miR-222-3p inhibitor 组 miR-222-3p 的相对表达量显著低于 inhibitor NC 组和 NC 组（$P < 0.05$）；inhibitor NC 组和 NC 组间 miR-222-3p 的表达水平差异无统计学意义（$P > 0.05$），见图 1。

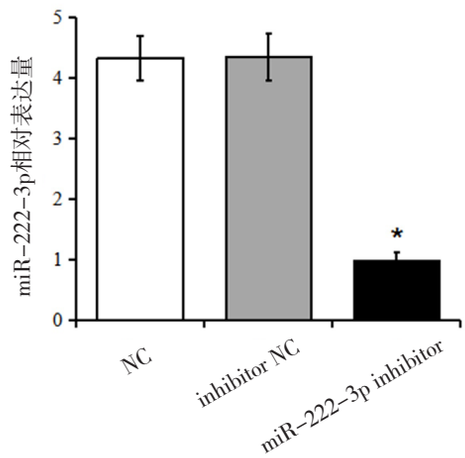

图1 各组细胞miR-222-3p的表达（n=3）

Figure 1. Expression of miR-222-3p in each group (n=3)

注：与inhibitor NC组和NC组相比，$^*P < 0.05$

2.3 miR-222-3p对CAL-27细胞增殖能力的影响

MTT 实验结果显示，miR-222-3p inhibitor 组 CAL-27 细胞在 48，72，96 h 处的增殖能力显著低于 inhibitor NC 组和 NC 组（$P < 0.05$），而 inhibitor NC 组和 NC 组间差异无统计学意义（$P > 0.05$），见图 2。

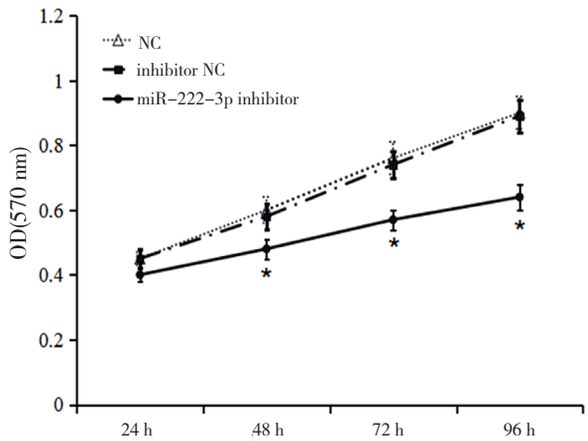

图2 miR-222-3p对CAL-27细胞增殖能力的影响（n=3）

Figure 2. Effects of miR-222-3p on proliferation of CAL-27 cells (n=3)

注：与inhibitor NC组和NC组相比，$^*P < 0.05$

2.4 miR-222-3p对CAL-27细胞凋亡的影响

Annexin-V/PI 双染结果显示，miR-222-3p inhibitor 组的细胞凋亡率显著高于 inhibitor NC 组和 NC 组（$P < 0.05$），而 inhibitor NC 组和

NC 组间差异无统计学意义（$P > 0.05$），见图 3-A。进一步对凋亡下游标志蛋白进行检测，结果显示，与 inhibitor NC 组和 NC 组相比，miR-222-3p inhibitor 组 BAX 蛋白表达水平显著升高（$P < 0.05$），Bcl-2 蛋白表达水平显著降低（$P < 0.05$）；inhibitor NC 组和 NC 组细胞中 BAX 和 Bcl-2 的蛋白表达水平差异无统计学意义（$P > 0.05$），见图 3-B。

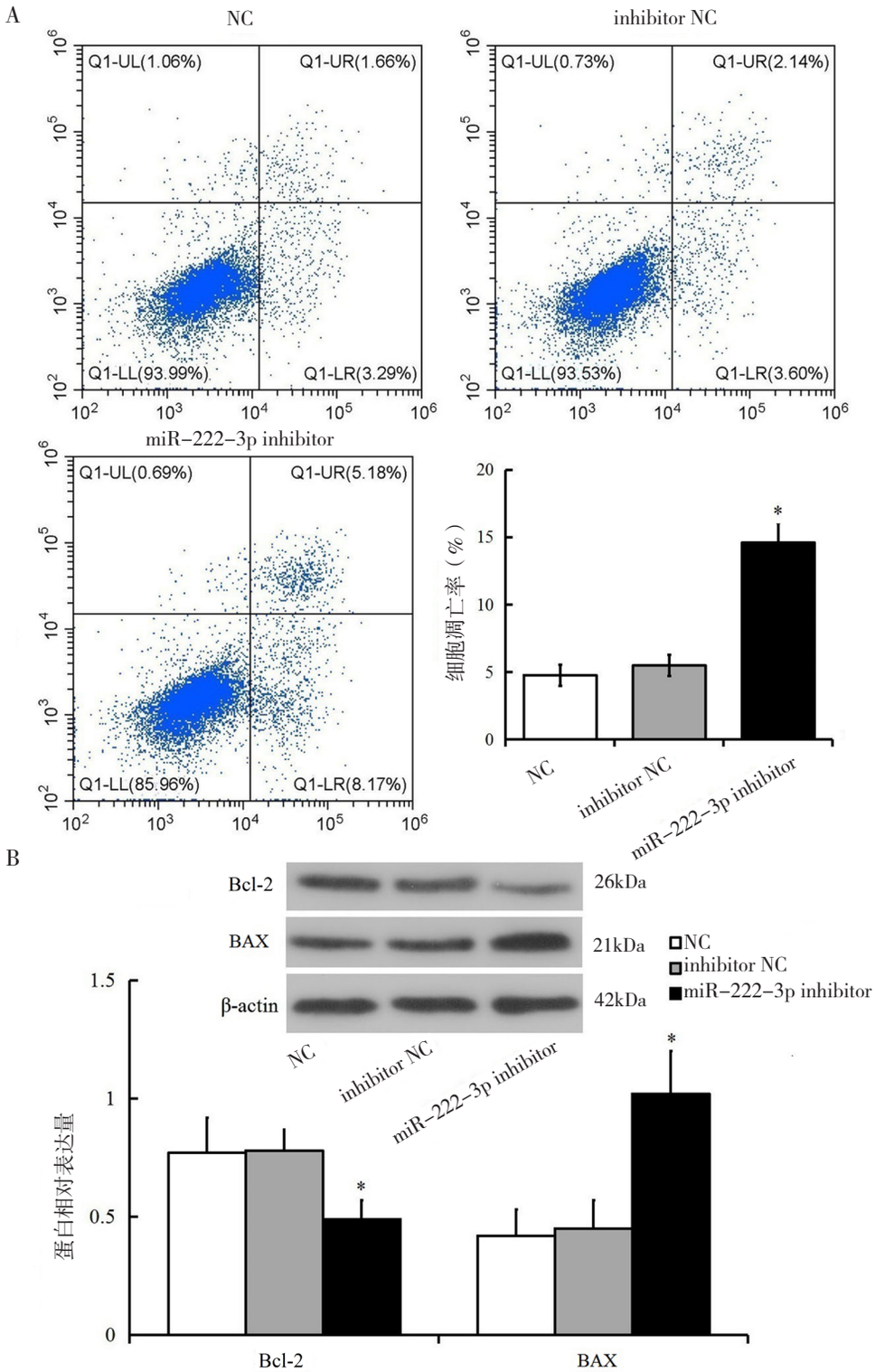

图3 miR-222-3p对CAL-27细胞凋亡的影响（n=3）

Figure 3. Effect of miR-222-3p on apoptosis of CAL-27 cells (n=3)

注：A：流式细胞术检测细胞凋亡；Q1-UL：机械错误；Q1-UR：晚期凋亡或坏死细胞；Q1-LL：活细胞；Q1-LR：早期凋亡细胞；B：蛋白质印迹法检测BAX和Bcl-2蛋白水平；与inhibitor NC组和NC组相比，$^{*}P<0.05$

2.5 miR-222-3p对CAL-27细胞侵袭的影响

Transwell检测结果显示，miR-222-3p inhibitor组细胞侵袭数量均显著低于inhibitor NC组和NC组（$P < 0.05$），见图4-A。蛋白质印迹法分析显示，与inhibitor NC组和NC组相比，miR-222-3p inhibitor组MMP-2和N-cadherin蛋白表达水平均显著降低（$P < 0.05$），E-cadherin表达水平显著升高（$P < 0.05$），inhibitor NC组和NC组细胞中MMP-2、N-cadherin和E-cadherin的蛋白表达水平差异无统计学意义（$P > 0.05$），见图4-B。

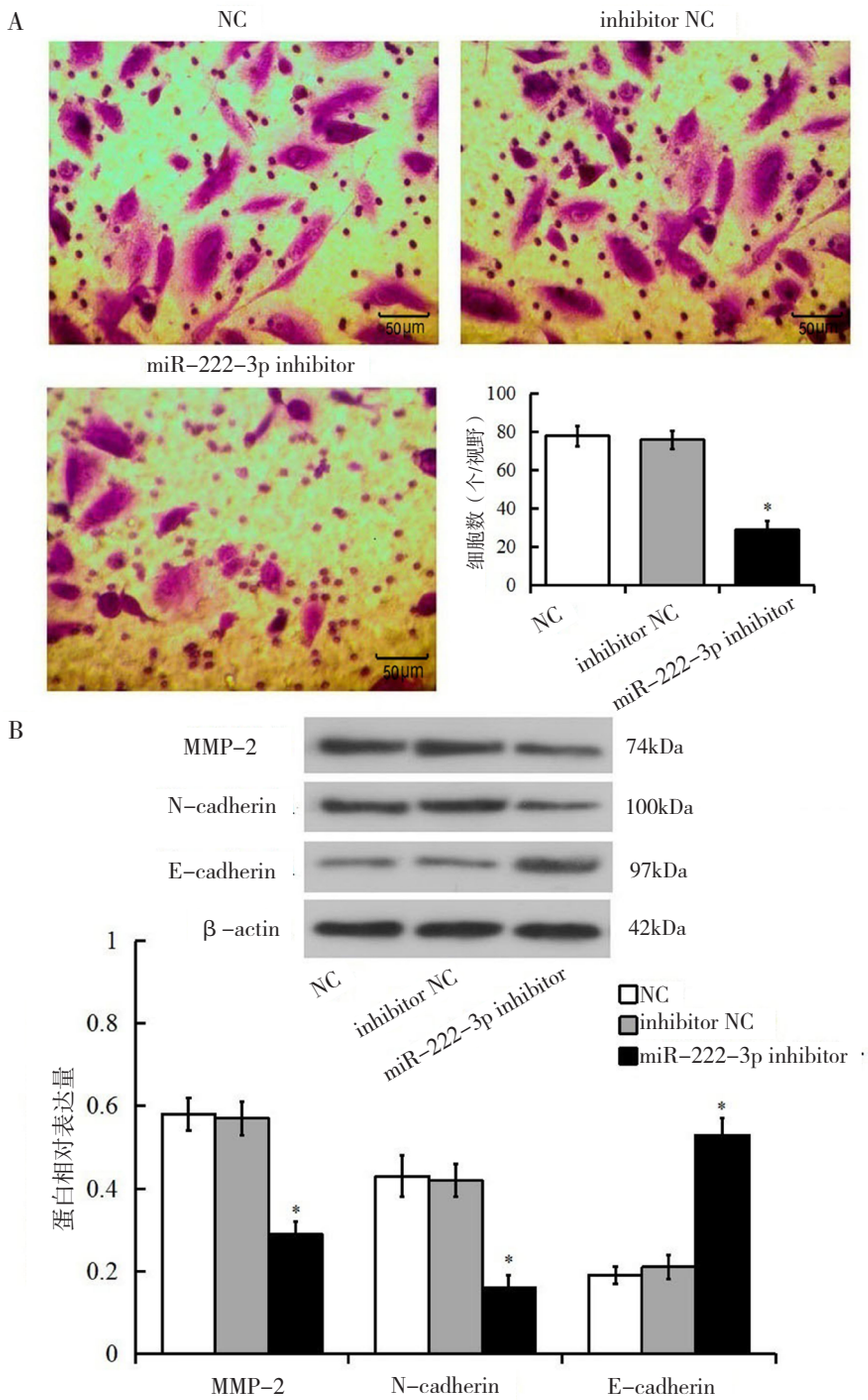

图4 miR-222-3p对CAL-27细胞侵袭的影响（n=3）

Figure 4. Influence of miR-222-3p on CAL-27 cell invasion (n=3)

注：A：Transwell检测细胞侵袭；B：蛋白质印迹法检测MMP-2、N-cadherin和E-cadherin蛋白水平；与inhibitor NC组和NC组相比，$^{*}P<0.05$

3 讨论

OSCC 是头颈部最常见的恶性肿瘤之一，易发生区域淋巴结转移，严重威胁人类的健康[8]，因此寻找新的分子靶点对 OSCC 的诊断、治疗及预后评估具有临床意义。miRNA 现已成为生物医学领域的研究热点，其通过调控下游目标基因的表达，在细胞增殖、分化及免疫调节等多种生理病理学过程中发挥着重要作用[9]。目前研究发现多种 miRNA 在肿瘤中异常表达，可作为肿瘤早期诊断、预后评估及靶向治疗的靶点[10]。因此分析 OSCC 相关 miRNA 的作用及机制，有利于探寻新的治疗靶点。

miR-222-3p 是一类重要的 miRNA，在多种恶性肿瘤中高表达，与肿瘤的发生发展密切相关[11-12]。miR-222-3p 在甲状腺癌中高表达，其可通过靶向 SLC4A4 促进甲状腺癌细胞的增殖、侵袭和迁移，有望成为甲状腺癌患者的分子治疗靶点[13]。miR-222-3p 在宫颈癌患者血清和宫颈癌细胞系 SiHa 中表达上调，其通过抑制 SOCS5 增强宫颈癌细胞 SiHa 增殖、迁移和侵袭能力，可能参与宫颈癌的发病[14]。Sun 等研究发现 miR-222-3p 在肝细胞癌组织和细胞系中显著上调，乙型肝炎病毒（hepatitis b virus，HBV）感染后 miR-222-3p 进一步升高；miR-222-3p 通过下调 THBS1 调控 HBV (-) HepG2 细胞、HBV (+) HepG2.2.15 细胞、Huh7-V 细胞、Huh7-HBV 细胞的增殖和凋亡，说明 miR-222-3p 可能是肝细胞癌和 HBV 相关肝细胞癌潜在的诊断和治疗靶点[15]。此外，许云等研究发现 OSCC 组织中 miRNA-222 表达升高，且与肿瘤直径、TNM 分期、分化程度、淋巴结转移有关，可作为诊断和病情判断的生物学指标[16]。miR-222-3p 在 OSCC 患者外周血中高表达，且与 pTNM 分期和淋巴结转移及生存期密切相关[17]。然而，miR-222-3p 在 OSCC 中的作用尚未明确。

为探讨 miR-222-3p 在 OSCC 中的作用，本研究检测了 miR-222-3p 在 CAL-27 细胞中的表达，结果发现 miR-222-3p 在 CAL-27 细胞株中高表达。为进一步探讨 miR-222-3p 在 OSCC 进展中的功能，通过 CAL-27 细胞中转染 miR-222-3p inhibitor，结果发现，转染 miR-222-3p inhibitor 后，CAL-27 细胞的凋亡率显著升高，增殖、侵袭能力显著降低。此外，通过分析凋亡及侵袭相关蛋白表达发现，下调 miR-222-3p 表达后，BAX、E-cadherin 蛋白表达水平明显升高，Bcl-2、MMP-2 和 N-cadherin 蛋白表达水平明显降低，说明下调 miR-222-3p 表达能够抑制 CAL-27 细胞的增殖和侵袭，促进细胞凋亡，与 SCC-15 和 Tca-83 细胞中的研究结果一致[18]，说明在不同 OSCC 细胞系中，miR-222-3p 的作用基本一致。但 miR-222-3p 是如何调控 OSCC 细胞的增殖、侵袭和凋亡及其在不同 OSCC 细胞系中的作用机制还需更深入的探讨。

综上所述，miR-222-3p 在 CAL-27 细胞中高表达，下调 miR-222-3p 表达能抑制 CAL-27 细胞的增殖和侵袭能力，并促进细胞凋亡，可作为 OSCC 的生物治疗的潜在靶标之一。

参考文献

1 Shahinas J, Hysi D. Methods and risk of bias in molecular marker prognosis studies in oral squamous cell carcinoma[J]. Oral Dis, 2018, 24(1-2): 115-119. DOI: 10.1111/odi.12753.

2 Wirsing AM, Ervik IK, Seppola M, et al. Presence of high-endothelial venules correlates with a favorable immune microenvironment in oral squamous cell carcinoma[J]. Mod Pathol, 2018, 31(6): 910-922. DOI: 10.1038/s41379-018-0019-5.

3 Saliminejad K, Khorram Khorshid HR, Soleymani Fard S, et al. An overview of microRNAs: biology, functions, therapeutics, and analysis methods[J]. J Cell Physiol, 2019, 234(5): 5451-5465. DOI: 10.1002/jcp.27486.

4 Ali Syeda Z, Langden SSS, Munkhzul C, et al. Regulatory mechanism of MicroRNA expression in cancer[J]. Int J Mol Sci, 2020, 21(5): 1723. DOI: 10.3390/ijms21051723.

5 陈青青，魏茜雪，严丽梅. HPV 感染宫颈癌组织 miR-222-3p 的表达及对宫颈癌细胞凋亡的影响[J]. 中国病原生物学杂志，2021, 16(3): 342-347. [Chen QQ, Wei QX, Yan LM. Expression of miR-222-3p in cervical cancer infected with HPV and its effect on the apoptosis of cervical cancer cells[J]. Journal of Parasitic Biology, 2021, 16(3): 342-347.] DOI: 10.13350/j.cjpb.210321.

6 Chen W, Li X. MiR-222-3p promotes cell proliferation and inhibits apoptosis by targeting PUMA (BBC3) in non-small cell lung cancer[J]. Technol Cancer Res Treat, 2020, 19: 1533033820922558. DOI: 10.1177/1533033820922558.

7 冯曜宇，张承磊，侯丽娟，等．敲降 miR-222-3p 靶向 PTEN 对甲状腺癌 131I 放疗抵抗的影响及其机制 [J]. 吉林大学学报（医学版），2021, 47(3): 677-686. [Feng YY, Zhang CL, Hou LJ, et al. Effect of miR-222-3p knockdown targeting PTEN on 131I radiotherapy resistance of thyroid cancer and its mechanism[J]. Journal of Jilin University(Medicine Edition), 2021, 47(3): 677-686.] DOI: 10.13481/j.1671-587X.20210318.

8 胡勤刚，赵星星．口腔鳞状细胞癌肿瘤相关成纤维细胞的研究进展 [J]. 口腔医学研究，2020, 36(4): 309-313. [Hu QG, Zhao XX. Advancement of cancer-associated fibroblasts in oral squamous cell carcinoma[J]. Journal of Oral Science Research, 2020, 36(4): 309-313.] DOI: 10.13701/j.cnki.kqyxyj.2020.04.001.

9 Hussen BM, Hidayat HJ, Salihi A, et al. MicroRNA: A signature for cancer progression[J]. Biomed Pharmacothera, 2021, 138: 111528. DOI: 10.1016/j.biopha.2021.111528.

10 马程程，王雪梅，韩奕垣，等．外周血 microRNA 在评估头颈部鳞状细胞癌淋巴结转移中的研究进展 [J]. 中国眼耳鼻喉科杂志，2020, 20(2): 132-135, 139. [Ma CC, Wang XM, Han YY, et al. Progress of peripheral blood microRNA expression in evaluating lymph node metastasis of head and neck squamous cell carcinoma[J]. Chinese Journal of Ophthalmology and Otorhinolaryngology, 2020, 20(2): 132-135, 139.] DOI: 10.14166/j.issn.1671-2420.2020.02.017.

11 Wang D, Sang Y, Sun T, et al. Emerging roles and mechanisms of microRNA-222-3p in human cancer (Review)[J]. Int J Oncol, 2021, 58(5): 20. DOI: 10.3892/ijo.2021.5200.

12 丁金旺，王克义，罗定存，等．血清微小 RNA-222-3p 在甲状腺乳头状癌中的表达及意义 [J]. 中国耳鼻咽喉头颈外科，2017, 24(1): 20-23. [Ding JW, Wang KY, Luo DC, et al. Clinical significance of serum microRNA-222-3p expression in papillary thyroid carcinoma[J], Chinese Archives of Otolaryngology-Head and Neck Surgery, 2017, 24(1): 20-23.] DOI: 10.16066/j.1672-7002.2017.01.003.

13 Zhang C, Chang Q, Hu Y, et al. MiR-222-3p promotes the proliferation, migration and invasion of papillary thyroid carcinoma cells through targeting SLC4A4[J]. Histol Histopathol, 2021, 36(11): 1199-1207. DOI: 10.14670/HH-18-387.

14 薄晓莉，哈丽亚·哈力木别克，潘静，等．miR-222-3p 靶向 SOCS5 促进宫颈癌细胞增殖，迁移和侵袭 [J]. 医学研究杂志，2020, 49(4): 100-104, 112. [Bo XL, Halia Halimbek, Pan J, et al. miR-222-3p promotes proliferation, migration and invasion of cervical cancer cells by targeting SOCS5[J]. Journal of Medical Research, 2020, 49(4): 100-104, 112] DOI: 10.11969/j.issn.1673-548X.2020.04.021.

15 Sun Y, Shi P, Wu Q, et al. MiR-222-3p induced by hepatitis B virus promotes the proliferation and inhibits apoptosis in hepatocellular carcinoma by upregulating THBS1[J]. Hum Cell, 2021, 34(6): 1788-1799. DOI: 10.1007/s13577-021-00577-1.

16 许云，高彤彤．口腔鳞状细胞癌组织 miRNA-222 表达及其意义 [J]. 山东医药，2017, 57(48): 87-89. [Xu Y, Gao TT. Expression and significance of miRNA-222 in oral squamous cell carcinoma[J]. Shandong Medical Journal, 2017, 57(48): 87-89.] DOI: 10.3969/j.issn.1002-266X.2017.48.030.

17 杨凯成，杨蕾，赵建广，等．口腔鳞状细胞癌患者外周血 microRNA 的表达及预后意义 [J]. 口腔医学研究，2020, 36(5): 428-432. [Yang KC, Yang L, Zhao JG, et al. Expression and prognostic significance of micrornas in peripheral blood of patients with oral squamous cell carcinoma [J]. Journal of Dental Research, 2020, 36(5): 428-432.] DOI: 10.13701/j.cnki.kqyxyj.2020.05.007.

18 Yang K, Chen Y, Cui Z, et al. MicroRNA-222-3p participates in the development of oral squamous cell carcinoma by targeting CDKN1B[J]. J Oral Pathol Med, 2020, 49(7): 621-629. DOI: 10.1111/jop.12986.

收稿日期：2023 年 02 月 17 日 修回日期：2023 年 03 月 20 日
本文编辑：桂裕亮 曹 越

引用本文：杨淑银，岳二丽，郭留云，等. miR-222-3p对口腔鳞状细胞癌CAL-27细胞增殖、凋亡和侵袭的影响[J]. 医学新知，2023, 33(5): 343-349. DOI: 10.12173/j.issn.1004-5511.202302031
Yang SY, Yue EL Guo LY, et al. Effects of miR-222-3p on proliferation, apoptosis and invasion of oral squamous cell carcinoma CAL-27 cells[J]. Yixue Xinzhi Zazhi, 2023, 33(5): 343-349. DOI: 10.12173/j.issn.1004-5511.202302031