

# Chi-CpG NP 的制备及其对 rNMB0315 蛋白的免疫效果

王雁<sup>1</sup>, 李振宇<sup>2</sup>

1. 南华大学衡阳医学院附属第二医院手术室, 湖南衡阳 421001; 2. 衡南县人民医院, 湖南衡阳 421199

**[摘要]** **目的** 制备黏膜免疫佐剂 Chi-CpG NP, 并检测其对重组 B 群脑膜炎奈瑟菌 0315 蛋白 (rNMB0315) 的免疫效果。**方法** 用壳聚糖纳米颗粒 (Chi NP) 包裹免疫刺激分子 (CpG-ODN) 合成 Chi-CpG NP, 随后检测其理化性质和安全性。将不同黏膜免疫佐剂与 rNMB0315 充分混合、吸附, 滴鼻免疫雌性 BALB/c 小鼠, 检测 PBS 组、rNMB0315 组、rNMB0315+CpG 组、rNMB0315+Chi NP 组、rNMB0315+Chi-CpG NP 组小鼠免疫 42 天后的体液免疫 (IgG、IgG1、IgG2a、sIgA)、细胞免疫水平 [白细胞介素 (IL)-4、 $\gamma$  干扰素 (IFN- $\gamma$ )、IL-17A]、免疫保护效果以及血清体外杀菌活性。**结果** 成功制备的 Chi-CpG NP 呈球形, 大小均一, 有较好的吸附性能和良好的安全性。小鼠免疫 42 天后, 体液免疫和细胞免疫水平 rNMB0315+Chi-NP 组、rNMB0315+Chi-CpG NP 组高于 rNMB0315 组 ( $P < 0.05$ ); rNMB0315+Chi-CpG NP 组高于 rNMB0315+CpG 组和 rNMB0315+Chi-NP 组 ( $P < 0.05$ )。致死剂量 B 群脑膜炎奈瑟菌攻击各组小鼠后, rNMB0315+Chi-CpG NP 组小鼠存活率最高; 血清体外杀菌抗体滴度为 1:4。**结论** 成功制备了 Chi-CpG NP。Chi-CpG NP 能增强 rNMB0315 蛋白的免疫效果, 提高小鼠的存活率。

**[关键词]** Chi-CpG NP; B 群脑膜炎奈瑟菌; rNMB0315 蛋白; 免疫佐剂

**[中图分类号]** R392

**[文献标识码]** A

## Preparation of Chi-CpG NP and its immune effects on the recombinant protein rNMB0315

WANG Yan<sup>1</sup>, LI Zhenyu<sup>2</sup>

1. Operating Room, the Second Affiliated Hospital, Hengyang Medical School, University of South China, Hengyang 421001, Hunan, China; 2. Hengnan People's Hospital, Hengyang 421199, Hunan, China

**[ABSTRACT]** **Aim** To prepare the mucosal adjuvants of Chi-CpG NP, and subsequently immunize mice with recombinant *Neisseria meningitidis* serogroup B 0315 protein (rNMB0315) by using Chi-CpG NP before the observation of immunostimulatory effects. **Methods** The physicochemical characteristics and safety of Chi-CpG NP were assessed by incorporating immunopotentiators (CpG-ODN) into Chitosan nanoparticles (Chi NP). Female BALB/c mice were immunized intranasally with various mucosal immune adjuvants containing the rNMB0315 protein. On days 42 days after immunization, the humoral (IgG, IgG1, IgG2a, sIgA), cellular (interleukin 4, interferon- $\gamma$ , interleukin 17A) immunologic responses, as well as the serum bactericidal assay and immune protective effect, were evaluated in the PBS, rNMB0315, rNMB0315+CpG, rNMB0315+Chi NP, and rNMB0315+Chi-CpG NP groups. **Results** The Chi-CpG nanoparticles demonstrated favorable adsorption and safety properties and exhibited a spherical morphology. On days 42 days after immunization, the levels of humoral and cellular immunity in the rNMB0315+Chi NP group and rNMB0315+Chi-CpG NP group were higher than those in the rNMB0315 group ( $P < 0.05$ ). Moreover, the rNMB0315+Chi-CpG NP group elicited a higher level of humoral and cellular immunity than the rNMB0315+CpG, or the rNMB0315+Chi-NP group ( $P < 0.05$ ). After a lethal dose of *Neisseria meningitidis* serogroup B infection, the survival rate of mice in the rNMB0315+Chi-CpG NP group was the highest, with serum bactericidal titers of 1:4 against this strain. **Conclusion** Chi-CpG NP has been successfully prepared. Chi-CpG NP can enhance the immune effects of rNMB0315 protein and improve the survival rate of mice.

**[KEY WORDS]** Chi-CpG NP; *Neisseria meningitidis* serogroup B; rNMB0315; mucosal adjuvant

B 群脑膜炎奈瑟菌 (*Neisseria meningitidis* serogroup B, MenB) 可穿过鼻黏膜屏障, 在血液中大量

繁殖, 引起流行性脑脊髓膜炎 (流脑)。研究指出, 针对呼吸道传染性疾, 黏膜免疫为更有效的免疫

**[收稿日期]** 2023-08-27

**[修回日期]** 2023-12-22

**[基金项目]** 湖南省自然科学基金项目 (2023JJ60371)

**[作者简介]** 王雁, 硕士, 主管护师, 研究方向为抗感染免疫, E-mail 为 lzyhalzy@163.com。通信作者李振宇, 博士, 主管检验师, 研究方向为病原体的致病机制, E-mail 为 348090930@qq.com。

方式,因此研发安全高效黏膜疫苗对流脑的预防具有重要意义<sup>[1-3]</sup>。

CpG的寡脱氧核糖核苷酸(CpG-oligodeoxynucleotides, CpG-ODN)作为黏膜免疫佐剂可上调共刺激分子表达,诱发机体的系统免疫和黏膜免疫,但生物稳定性不佳、易被核酸酶降解,需有效的载体来提高其稳定性和有效性<sup>[4-5]</sup>。壳聚糖纳米颗粒(chitosan nanoparticles, Chi NP)为黏膜疫苗载体,可促进抗原吸收并提呈给抗原提呈细胞,引起黏膜免疫反应<sup>[6]</sup>。研究证实, B群脑膜炎奈瑟菌0315(*Neisseria meningitidis* serogroup B 0315, NMB0315)为MenB疫苗的候选抗原<sup>[7]</sup>。本研究制备黏膜免疫佐剂Chi-CpG NP,检测其对重组NMB0315(recombinant NMB0315, rNMB0315)蛋白的免疫效果。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

MenB标准株(MC58)来源于美国ATCC公司; *E. coli* BL21重组表达菌(pET-30a/NMB0315)由本实验室保存; 140只3~4周龄雌性BALB/c小鼠[体质量(16±2.1)g]来源于湖南斯莱克景达实验动物有限公司。佐剂Chi NP溶液由广汉恒宇新材料有限公司惠赠; CpG-ODN 1826(TCCATGACGTTCTGACGTT)由上海生工合成; 辣根过氧化物标记山羊抗小鼠抗体购自美国Proteintech公司, 细胞因子白细胞介素(interleukin, IL)-4、 $\gamma$ 干扰素(interferon- $\gamma$ , IFN- $\gamma$ )及IL-17A试剂盒购自美国eBioscience公司。

### 1.2 蛋白疫苗的制备

将保存的pET-30a/NMB0315扩增培养, 1.0 mmol/L IPTG, 30 °C, 摇床, 180 r/min, 诱导表达6 h, NMB0315蛋白采用Ni-NTA亲和层析法进行纯化, BCA法定量, SDS-PAGE分析纯度。

### 1.3 Chi-CpG NP悬液的制备和安全性分析

将1 500  $\mu$ g CpG-ODN溶于0.01 mol/L硫酸钠溶液配制成1 500 mg/L溶液; 取等量Chi NP溶液和CpG-ODN溶液于55 °C水浴30 min; 随后将Chi NP加入到CpG-ODN溶液中, 涡流震荡30 s, 室温静置30 min, 制备Chi-CpG NP悬液。聚合物分散指数(polydispersity index, PDI)及Zeta电位由Zetasizer电位仪测定。透射电子显微镜下观察Chi-CpG NP形态, 测定上清中游离的蛋白含量评价其吸附蛋白的能力。

将40只雌性BALB/c小鼠于SPF环境中适应性饲养7天, 随机分为PBS组、CpG组、Chi NP组、

Chi-CpG NP组, 每组10只。PBS组采用20  $\mu$ L PBS, CpG组采用15  $\mu$ g CpG, Chi NP组采用20  $\mu$ L Chi NP, Chi-CpG NP组采用15  $\mu$ g Chi-CpG NP, 各组均每天滴鼻1次, 连续7天, 各组小鼠滴鼻免疫液体的终体积为20  $\mu$ L。每天称量各组小鼠体质量, 第8天取各组小鼠肺组织HE染色, 观察炎症反应的程度评价佐剂对免疫小鼠肺组织的影响。

### 1.4 动物免疫和标本收集

将100只BALB/c小鼠随机分为PBS组、rNMB0315组、rNMB0315+CpG组、rNMB0315+Chi NP组、rNMB0315+Chi-CpG NP组, 每组20只。PBS组采用20  $\mu$ L PBS, rNMB0315组采用30  $\mu$ g rNMB0315, rNMB0315+CpG组采用30  $\mu$ g rNMB0315+15  $\mu$ g CpG, rNMB0315+Chi NP组采用30  $\mu$ g rNMB0315+20  $\mu$ L Chi NP, rNMB0315+Chi-CpG NP组采用30  $\mu$ g rNMB0315+含15  $\mu$ g Chi-CpG NP处理小鼠, 各组小鼠滴鼻免疫液体的终体积为20  $\mu$ L。各组小鼠经乙醚麻醉后分别在第0、7、14、21天经鼻腔免疫。收集第0、7、14、21、42天小鼠血液; 收集第42天小鼠阴道灌洗液及鼻腔灌洗液; 第42天无菌获取脾脏, 于超净工作台中制成单个细胞悬液。

### 1.5 Chi-CpG NP辅佐的rNMB0315疫苗免疫活性检测

1.5.1 体液免疫检测 rNMB0315蛋白包被ELISA板, 取第42天小鼠阴道灌洗液、鼻腔灌洗液或取第0、7、14、21、42天血清作为一抗, 间接ELISA法检测小鼠sIgA水平、总IgG及亚类, 酶标仪读取450 nm处光密度(optical density, OD)值。

1.5.2 细胞免疫检测 将上述收集的淋巴细胞悬液计数并将细胞调整至 $6.0 \times 10^6$ 个/mL, 1 mL/孔加至细胞培养板中, rNMB0315蛋白刺激, 于5% CO<sub>2</sub>, 37 °C培养48 h, 吸出上清, ELISA检测IL-4、IFN- $\gamma$ 、IL-17A水平。

1.5.3 疫苗的免疫保护效果观察和免疫血清体外杀菌活性实验 免疫42天后, 各组小鼠腹腔注射致死剂量MC58<sup>[7]</sup>后, 并观察小鼠14天内存活情况。刮取MC58菌苔配制成 $4 \times 10^3$ 个/mL菌液。再将菌液与补体等体积混匀。待测血清56 °C 40 min灭活, 用无菌PBS按1:2、1:4、1:8、1:16、1:32倍比稀释。将12.5  $\mu$ L菌液与12.5  $\mu$ L补体(人血清)混合再与25  $\mu$ L稀释的待检血清混合, 37 °C温育1 h。将混合物均匀涂布于巧克力琼脂培养平板, 37 °C 5% CO<sub>2</sub>过夜培养。设置阳性对照组(诊断血清)、阴性对照(包括灭活补体+菌液、血清+灭活补体+菌液、补体+菌液)。血清体外杀菌活性用于评

估脑膜炎球菌疫苗的保护效力。分别以阴性对照和阳性对照为标准判定结果,抑制 50% 脑膜炎奈瑟菌量生长的血清最大稀释度的倒数为小鼠血清杀菌抗体滴度。

### 1.6 统计学处理

采用 Graphpad Prism8 软件分析。组间比较采用方差分析。 $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 蛋白的鉴定

纯化分析结果显示,得到与 rNMB0315 相对分子质量 46 kDa 相符的目的条带(图 1)。

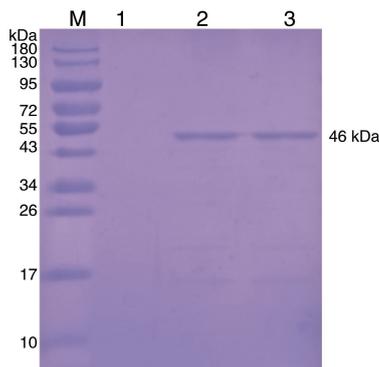


图 1 rNMB0315 蛋白鉴定结果

M 为 Marker;1 为 E. coli BL21;2,3 为纯化的 rNMB0315。

### 2.2 Chi-CpG NP 特性检测

2.2.1 Chi-CpG NP 形态及吸附能力 成功制备 Chi-CpG NP。Chi-CpG NP 形态与 Chi NP 相似,类似球形,大小均一,分散均匀,未出现明显的聚集。Chi-NP、Chi-CpG NP 纳米颗粒均具有较好的蛋白吸附特性,吸附率分别为  $(91.5 \pm 8.5)\%$ 、 $(85.5 \pm 8.2)\%$ ,但差异无显著性( $P > 0.05$ ;图 2)。

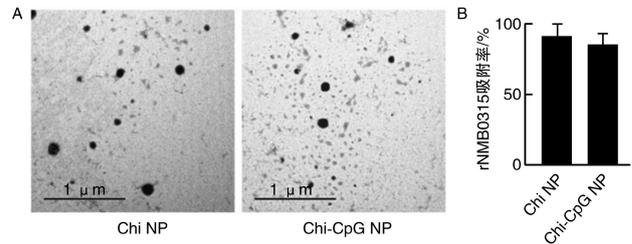


图 2 Chi-CpG NP 形态及吸附能力

A 为 Chi NP 和 Chi-CpG NP 外形(透射电子显微镜);

B 为 Chi NP 和 Chi-CpG NP 对 rNMB0315 的吸附率。

2.2.2 Chi-CpG NP 的理化性质 Chi NP、Chi-CpG NP 纳米颗粒粒径 120 ~ 150 nm、表面电位 10 ~ 15 mV、PDI 均小于 0.5,结果证明 CpG-ODN 装载到 Chi NP 对其理化性质影响较小。

2.2.3 Chi-CpG NP 免疫安全性评估 各组小鼠连续 7 天体重稳步增长,且增长曲线近似,但组内及组间差异均无显著性( $P > 0.05$ );HE 结果显示,4 组小鼠肺组织可见完整的肺泡,仅有轻微的白细胞浸润(图 3)。

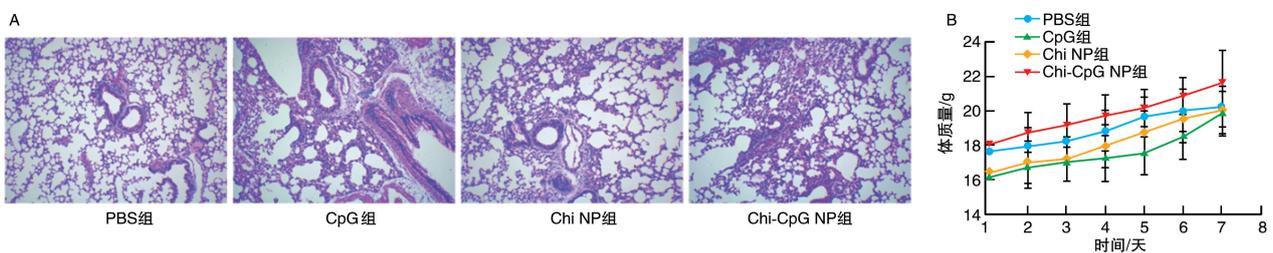


图 3 Chi-CpG NP 安全性评估

A 为各组小鼠肺组织 HE 染色结果(200×);B 为各组小鼠体质量变化。

### 2.3 Chi-CpG NP 辅佐的 rNMB0315 疫苗的免疫活性

2.3.1 体液免疫应答 从第 7 天开始,各免疫组 IgG、IgG1、IgG2a 随着时间递增而升高,并且在第 42 天达峰值( $P < 0.05$ )。在第 21、42 天时,IgG、IgG1、IgG2a rNMB0315 + CpG 组、rNMB0315 + Chi-NP 组、rNMB0315 + Chi-CpG NP 组高于 rNMB0315 组( $P < 0.05$ );rNMB0315 + Chi-CpG NP 组高于 rN-

MB0315 + CpG 组和 rNMB0315 + Chi-NP 组( $P < 0.05$ ;图 4)。

2.3.2 黏膜免疫应答 第 42 天时,小鼠鼻腔灌洗和阴道灌洗液中特异性 sIgA 水平 rNMB0315 + Chi-CpG NP 组、rNMB0315 + Chi-NP 组明显高于 rNMB0315 组( $P < 0.05$ ),rNMB0315 + Chi-CpG NP 组高于 rNMB0315 + CpG 组和 rNMB0315 + Chi NP 组( $P < 0.05$ ;图 5)。

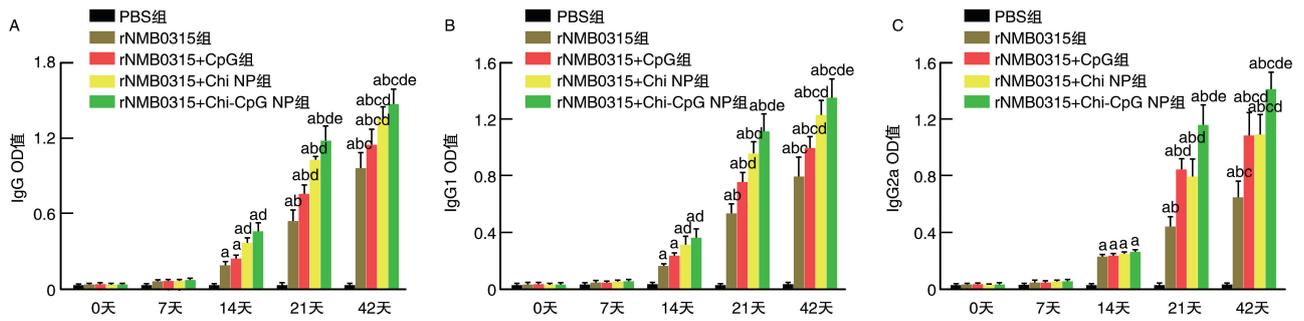


图4 不同时间免疫后特异性体液免疫应答

a 为  $P < 0.05$ , 与同组 7 天比较; b 为  $P < 0.05$ , 与同组 14 天比较; c 为  $P < 0.05$ , 与同组 21 天比较; d 为  $P < 0.05$ , 与 rNMB0315 组同时间比较; e 为  $P < 0.05$ , 与 rNMB0315+CpG 组和 rNMB0315+Chi NP 组同时间比较。

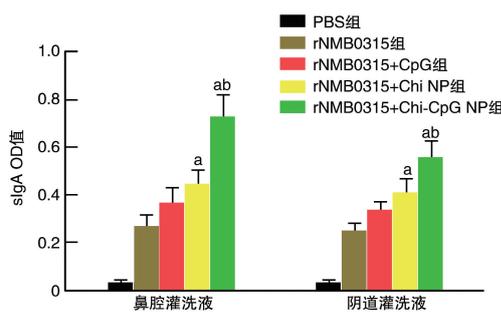


图5 免疫 42 天后特异性黏膜免疫应答

a 为  $P < 0.05$ , 与 rNMB0315 组比较; b 为  $P < 0.05$ , 与 rNMB0315+CpG 组和 rNMB0315+Chi NP 组比较。

2.3.3 各组小鼠细胞免疫水平比较 免疫后 42 天, rNMB0315+CpG 组 IFN- $\gamma$  水平高于 rNMB0315 组 ( $P < 0.05$ ); IL-4、IFN- $\gamma$ 、IL-17A 水平 rNMB0315+Chi-NP 组、rNMB0315+Chi-CpG NP 组高于 rNMB0315 组 ( $P < 0.05$ ); rNMB0315+Chi-CpG NP 组高于 rNMB0315+CpG 组和 rNMB0315+Chi NP 组 ( $P < 0.05$ ; 图 6)。

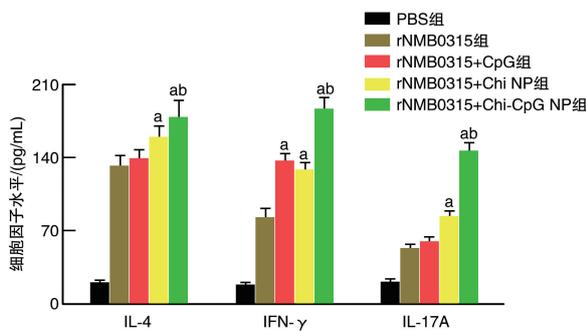


图6 各组小鼠细胞免疫水平比较

a 为  $P < 0.05$ , 与 rNMB0315 组比较; b 为  $P < 0.05$ , 与 rNMB0315+CpG 组和 rNMB0315+Chi NP 组比较。

2.4 Chi-CpG NP 辅佐的 rNMB0315 疫苗免疫保护效果 3 天内 rNMB0315+Chi-CpG NP 组、rNMB0315+

Chi-NP 组、rNMB0315+CpG 组、rNMB0315 组小鼠存活率分别为 80%、70%、50%、40% (图 7)。免疫第 42 天, rNMB0315+Chi-CpG NP 组小鼠免疫血清杀菌抗体滴度为 1:4, 其他免疫组为 1:2。

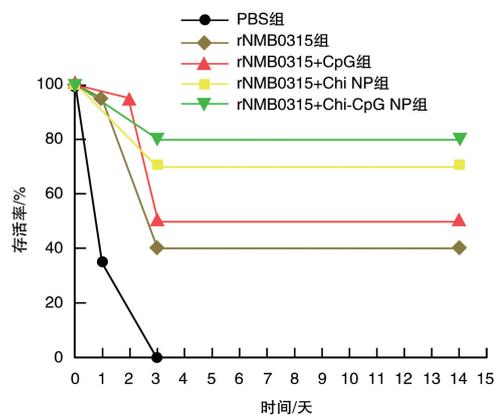


图7 各组疫苗免疫小鼠 MC58 攻击后的存活率

### 3 讨论

脑膜炎球菌主要通过呼吸道感染, 诱导呼吸道黏膜免疫可有效抵御脑膜炎球菌侵袭<sup>[1,8]</sup>。高效的黏膜免疫能提高抗原的免疫原性, 刺激机体产生高效的免疫应答<sup>[9]</sup>。研究表明, 纳米颗粒诱导机体产生黏膜和系统免疫应答<sup>[10-11]</sup>。Sadati 等<sup>[12]</sup>发现, Chi-CpG 能显著增强小鼠的体液免疫和细胞免疫从而降低小鼠死亡率。本研究结果显示, Chi-CpG NP 辅佐 rNMB0315 滴鼻免疫小鼠, 可使小鼠机体免疫效果增强, 小鼠的存活率提高。

研究证实, 粒径在 100 ~ 500 nm 的纳米颗粒可有效穿过黏膜屏障, 使抗原有效地被抗原提呈细胞摄取<sup>[13]</sup>。本研究所合成的 Chi-CpG NP 粒径 120 ~ 150 nm, 可递送抗原至免疫细胞, 改善抗原稳定性并加强其免疫原性; 安全性评估实验证实未导致小鼠

肺部发生炎症改变,安全性良好。评估脑膜炎球菌疫苗有效性的指标是血清学保护效力<sup>[14-15]</sup>。本研究检测结果显示,Chi-CpG NP 辅佐 rNMB0315 诱导产生的特异性抗体水平显著提升,其原因是 CpG-ODN 不稳定容易被核酸酶降解,而 Chi NP 能使 CpG-ODN 有效递送,并被抗原提呈细胞有效识别,从而激发免疫应答<sup>[16]</sup>。

脑膜炎球菌感染机体首先在鼻黏膜黏附定植<sup>[17]</sup>,而 sIgA 是黏膜抗感染免疫应答中的主要保护因子,具有抗病原菌定植的作用,能中和病原体的毒力分子<sup>[18]</sup>。本研究结果显示,Chi-CpG NP 辅佐的 rNMB0315 疫苗可有效诱导局部和远端黏膜免疫应答。黏膜表面丰富的 Th17 细胞刺激辅助性 T 细胞产生 sIgA;Th17 细胞分泌 IL-17A 可有效抵御经黏膜系统入侵的微生物<sup>[19]</sup>。Li 等<sup>[20]</sup>证实,IL-17A 在抵御呼吸道病原体鹦鹉热衣原体感染中发挥着重要作用。本研究结果显示,Chi-CpG NP 辅佐的 rNMB0315 疫苗能诱导小鼠产生高水平的 IL-17A。

综上,本研究成功制备了 Chi-CpG NP。Chi-CpG NP 能增强 rNMB0315 蛋白的免疫效果,提高小鼠的存活率。

#### [参考文献]

- [1] 李旭刚. 因子 H 结合蛋白在 B 群脑膜炎球菌疫苗中的应用研究进展[J]. 微生物学免疫学进展, 2022, 50(6): 65-72.
- [2] MARSHALL H S, MCMILLAN M, KOEHLER A P, et al. Meningococcal B vaccine and meningococcal carriage in adolescents in Australia[J]. N Engl J Med, 2020, 382(4): 318-327.
- [3] BALMER P, BEESLAAR J, FINDLOW J, et al. Understanding immunogenicity assessments for meningococcal serogroup B vaccines[J]. Postgrad Med, 2020, 132(2): 184-191.
- [4] 徐莉, 李敏. CpG ODN 佐剂的研究进展及其药学研究的思考[J]. 中国生物制品学杂志, 2021, 34(12): 1524-1528.
- [5] 潘伟雄, 陈钰怡, 赵程珏, 等. 高效赤红球菌协同 CpG ODN 增强鸡禽流感疫苗的免疫效力[J]. 畜牧兽医学报, 2022, 53(12): 4367-4378.
- [6] ROZMAN N, TONG W Y, LEONG C R, et al. Potential antimicrobial applications of chitosan nanoparticles(ChNP)[J]. J Microbiol Biotechnol, 2019, 29(7): 1009-1013.
- [7] WU A A, LI K M, XIE M H, et al. Construction and protective immunogenicity of DNA vaccine pNMB0315 against Neisseria meningitidis serogroup B[J]. Mol Med Rep, 2018, 17(2): 3178-3185.
- [8] MATTHIAS K A, REVELLE A, CONNOLLY K L, et al. Deletion of major porins from meningococcal outer membrane vesicle vaccines enhances reactivity against heterologous serogroup B Neisseria meningitidis strains[J]. Vaccine, 2020, 38(10): 2396-2405.
- [9] 张一帆, 张媛, 李建, 等. 黏膜免疫佐剂研究进展[J]. 中国动物传染病学报, 2022, 30(6): 181-188.
- [10] LI X M, XING R E, XU C J, et al. Immunostimulatory effect of chitosan and quaternary chitosan: a review of potential vaccine adjuvants[J]. Carbohydr Polym, 2021, 264: 118050.
- [11] NOORAEI S, SARKAR LOTFABADI A, AKBARZADEHMOALEM KOLAIE M, et al. Immunogenicity of different types of adjuvants and nano-adjuvants in veterinary vaccines: a comprehensive review[J]. Vaccines (Basel), 2023, 11(2): 453.
- [12] SADATI S F, JAMALI A, ABDOLI A, et al. Simultaneous formulation of influenza vaccine and chitosan nanoparticles within CpG oligodesoxi nucleotides leads to dose-sparing and protects against lethal challenge in the mouse model[J]. Pathog Dis, 2018, 76(8): fty070.
- [13] DAS A, ALI N. Nanovaccine: an emerging strategy[J]. Expert Rev Vaccines, 2021, 20(10): 1273-1290.
- [14] HUANG F, JING X B, LI Y B, et al. Optimization of the process for preparing bivalent polysaccharide conjugates to develop multivalent conjugate vaccines against streptococcus pneumoniae or Neisseria meningitidis and comparison with the corresponding licensed vaccines in animal models[J]. Curr Med Sci, 2023, 43(1): 22-34.
- [15] JIANG T C, JI H, ZHANG L R, et al. Chitosan oligosaccharide exerts anti-allergic effect against shrimp tropomyosin-induced food allergy by affecting Th1 and Th2 cytokines[J]. Int Arch Allergy Immunol, 2019, 180(1): 10-16.
- [16] TAGHIZADEH M, DABAGHIAN M. Nasal administration of M2e/CpG-ODN encapsulated in N-trimethyl chitosan(TMC) significantly increases specific immune responses in a mouse model[J]. Arch Razi Inst, 2022, 77(6): 2259-2268.
- [17] DAVE N, ALBIHEYRI R S, WANFORD J J, et al. Variable disruption of epithelial monolayers by Neisseria meningitidis carriage isolates of the hypervirulent MenW cc11 and MenY cc23 lineages[J]. Microbiology (Reading), 2023, 169(2): 001305.
- [18] XU L L, HAO F, WANG J J, et al. Th1 and Th17 mucosal immune responses elicited by nasally inoculation in mice with virulence factors of Mycoplasma hyopneumoniae[J]. Microb Pathog, 2022, 172: 105779.
- [19] ESSIGMANN H T, HOFFMAN K L, PETROSINO J F, et al. The impact of the Th17: Treg axis on the IgA-Biome across the glycemic spectrum[J]. PLoS One, 2021, 16(10): e0258812.
- [20] LI Y M, WANG C, SUN Z J, et al. Simultaneous intramuscular and intranasal administration of chitosan nanoparticles-adjuvanted chlamydia vaccine elicits elevated protective responses in the lung[J]. Int J Nanomedicine, 2019, 14: 8179-8193.

(此文编辑 蒋湘莲)