· 原 著 ·

二甲双胍通过抑制内质网应激诱导的细胞凋亡 改善结肠炎黏膜上皮屏障损伤

王金钢^{1,2}, 陈春晓¹, 任于晗², 周辛欣¹, 俞珊²

1. 浙江大学附属第一医院消化内科, 浙江 杭州 310003

2. 浙江大学附属第一医院嵊州分院 嵊州市人民医院消化内科, 浙江 嵊州 312400

[摘要] 目的:探讨二甲双胍对溃疡性结肠炎黏膜上皮屏障损伤的作用及具体机制。方法:用人结肠癌细胞系 Caco-2 与人单核细胞系 THP-1 构建结肠炎体外细胞共培养模型,用 1 mmol/L 二甲双胍作用 24 h 后,运用流式细胞术检测肠上皮细胞凋亡情况,采用蛋白质印迹法检测紧密连接蛋白和内质网应激相关蛋白的表达水平。结果:与模型对照组比较,二甲双胍组细胞凋亡率从 $(14.22 \pm 2.34)\%$ 下降至 $(9.88 \pm 0.61)\%$ ($t=3.119, P<0.05$),紧密连接蛋白 1 和密封蛋白 1 相对表达量增加 ($t=5.172$ 和 3.546 , 均 $P<0.05$),内质网分子伴侣葡萄糖调节蛋白 (GRP) 78 和内质网应激诱导的凋亡相关分子 C/EBP 同源蛋白 (CHOP)、胱天蛋白酶 (caspase)-12 的蛋白表达水平下降 (均 $P<0.05$),蛋白激酶 R 样内质网激酶 (PERK) 和真核生物起始因子 2 α (eIF2 α) 的磷酸化水平下降 (均 $P<0.05$)。结论:二甲双胍可以通过减轻结肠炎肠上皮细胞的细胞凋亡和增加紧密连接蛋白的表达改善结肠炎肠黏膜上皮屏障损伤,其分子机制可能与抑制内质网应激诱导的细胞凋亡途径有关。

[关键词] 结肠炎, 溃疡性;二甲双胍;内质网应激;细胞凋亡;细胞共培养;紧密连接蛋白

[中图分类号] R310.17 **[文献标志码]** A

Metformin alleviates intestinal epithelial barrier damage by inhibiting endoplasmic reticulum stress-induced cell apoptosis in colitis cell model

WANG Jingang^{1,2}, CHEN Chunxiao¹, REN Yuhan², ZHOU Xinxin¹, YU Shan² (1. Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital, Zhejiang University School of Medicine, Hangzhou 310003, China; 2. Department of Gastroenterology, Shengzhou Branch of the First Affiliated Hospital of Zhejiang University School of Medicine, Shengzhou People's Hospital, Shengzhou 312400, Zhejiang Province, China)

收稿日期:2021-07-10 接受日期:2021-09-20

基金项目:绍兴市2018年度科技计划(2018C30161)

第一作者:王金钢,主治医师,主要从事肠道疾病的研究;E-mail: wangjingang628@163.com; <https://orcid.org/0000-0002-0568-7820>

通信作者:陈春晓,主任医师,硕士生导师,主要从事肠道疾病的研究;E-mail: 13906523922@126.com; <https://orcid.org/0000-0001-7536-1191>

Corresponding author: CHEN Chunxiao, E-mail: 13906523922@126.com, <https://orcid.org/0000-0001-7536-1191>

[**Abstract**] **Objective:** To investigate the effect and mechanism of metformin on intestinal epithelial barrier injury in ulcerative colitis. **Methods:** A cell model of colitis was established by co-culture of human colon cancer cell line Caco-2 and human monocyte cell line THP-1. The colitis model cells were treated with metformin at concentration of 1 mmol/L for 24 h. Flow cytometry was used to detect Caco-2 cell apoptosis, and Western blotting was used to detect the protein expression of tight junction proteins and endoplasmic reticulum stress-related proteins. **Results:** After metformin treatment, the apoptosis rate of Caco-2 cells was decreased from $(14.22 \pm 2.34)\%$ to $(9.88 \pm 0.61)\%$ ($t=3.119$, $P<0.05$), and the expression levels of tight junction protein-1 and claudin-1 increased ($t=5.172$ and 3.546 , both $P<0.05$). In addition, the expression levels of endoplasmic reticulum-related proteins glucose regulated protein (GRP) 78, C/EBP homologous protein (CHOP) and caspase-12, as well as the phosphorylation level of PRKR-like endoplasmic reticulum kinase (PERK) and eukaryotic translation initiation factor 2α (eIF2 α) decreased (all $P<0.05$). **Conclusion:** Metformin may alleviate the intestinal epithelial barrier damage in colitis by reducing intestinal epithelial cell apoptosis and increasing the expression of tight junction proteins, which may be associated with the inhibition of endoplasmic reticulum stress-induced apoptotic pathway.

[**Key words**] Colitis, ulcerative; Metformin; Endoplasmic reticulum stress; Apoptosis; Co-culture cell; Tight junction protein

[J Zhejiang Univ(Med Sci), 2021, 50(5): 627-632.]

[**缩略语**] 溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC); 异硫氰酸荧光素(fluorescein isothiocyanate, FITC); 碘化丙啶(propidium iodide, PI); 葡萄糖调节蛋白(glucose regulated protein, GRP); 蛋白激酶R样内质网激酶(PRKR-like endoplasmic reticulum kinase, PERK); 真核生物起始因子 2α (eukaryotic translation initiation factor 2α , eIF2 α); C/EBP同源蛋白(C/EBP homologous protein, CHOP); 胱天蛋白酶(cysteine aspartic acid specific protease, caspase); 聚偏二氟乙烯(polyvinylidene fluoride, PVDF); Tris缓冲液含0.1%吐温-20(tris-buffered saline with Tween-20, TBST); 电化学发光(electrochemiluminescence, ECL); 转录激活因子(activating transcription factor, ATF)

UC是一种累及直肠、结肠黏膜及黏膜下层的慢性非特异性炎症性疾病,主要表现为反复腹痛、腹泻、黏液脓血便,是炎症性肠病的主要亚型。UC的病因和发病机制尚不清楚,越来越多的证据表明肠道黏膜屏障功能受损是UC发病的关键因素^[1]。UC在西方发达国家的发病率和患病率很高,近年来随着饮食、精神因素的变化,包括中国在内的世界其他地区UC患者的数量正在迅速增加^[2]。UC患者病情多反复发作,病程长者癌变风险增加,临床药物治疗远期效果也不理想^[3],因此

寻找UC的有效治疗策略具有重要意义。

肠道上皮细胞在生理状态下依赖内质网对蛋白质进行折叠、修饰和分泌,其在维持肠道稳态中发挥着重要作用^[4]。当内质网稳态被破坏时,错误折叠和/或未折叠的蛋白质在内质网中积聚,导致细胞产生内质网应激。中等强度和短暂的内质网应激会诱导未折叠蛋白反应,从而减慢蛋白质翻译速度,导致蛋白质发生降解及折叠能力增强,从而恢复内质网稳态;但过强或时间过长的内质网应激会诱导细胞发生凋亡^[5],削弱肠道屏障功

能和激活肠道炎症反应,从而参与UC的发生发展^[6]。因此,靶向内质网应激是改善肠道黏膜屏障损伤、减轻肠道炎症的潜在策略。

二甲双胍是一种在临床上广泛应用的口服抗糖尿病药物,除了降血糖作用外,还具有抗炎、抗肿瘤、抗衰老和改善代谢等作用^[7-10]。既往小鼠模型和细胞模型研究均表明,二甲双胍具有增强肠道黏膜屏障、改善肠道炎症的作用^[11-16],但具体机制以及二甲双胍是否减轻内质网应激诱导的肠上皮细胞凋亡尚不明确。本研究运用人结肠癌细胞系Caco-2与人单核细胞系THP-1构建结肠炎体外细胞共培养模型,探究二甲双胍对结肠炎肠道屏障的作用,并进一步探讨内质网应激及其诱导的凋亡在其中扮演的角色。

1 材料与方法

1.1 细胞、试剂和仪器

Caco-2细胞和THP-1细胞来源于美国典型培养物保藏中心(ATCC)。细胞培养所用的DMEM高糖培养基和RPMI 1640培养基为美国Sigma公司产品;胎牛血清、胰蛋白酶、青-链霉素和非必需氨基酸为美国Gibco公司产品;二甲双胍为美国Selleck公司产品;FITC-Annexin V/PI细胞凋亡检测试剂盒为美国BD公司产品;紧密连接蛋白1抗体、密封蛋白1抗体、GRP78抗体、PERK抗体、磷酸化eIF2 α 抗体、eIF2 α 抗体、CHOP抗体、 β -actin抗体、细胞裂解液为美国Cell Signaling Technology公司产品;磷酸化PERK抗体、caspase-12抗体为英国Abcam公司产品;上样缓冲液为上海碧云天生物技术有限公司产品。流式细胞仪为美国BD公司产品;化学发光显影仪为上海勤翔科学仪器有限公司产品。

1.2 细胞共培养和药物干预

Caco-2细胞和THP-1细胞分别用含10%胎牛血清、1%青-链霉素和1%非必需氨基酸的DMEM高糖培养基和RPMI 1640培养基培养于含5%二氧化碳、37℃培养箱中。参照文献^[17]的方法建立结肠炎细胞模型,即为模型对照组。二甲双胍组在模型对照组的基础上向上室培养基中加入二甲双胍,使其终浓度达到1 mmol/L,作用时间为24 h。

1.3 流式细胞术检测细胞凋亡情况

将模型对照组和二甲双胍组细胞用不含乙二胺四乙酸的胰蛋白酶消化,收集细胞,用磷酸盐缓

冲液洗涤2次。向每个样本中加入300~400 μ L 1 $\times$ 结合缓冲液并重悬细胞,再加入5 μ L FITC-Annexin V染色液和5 μ L PI染色液,室温避光孵育15 min后上机检测。

1.4 蛋白质印迹法检测紧密连接蛋白及内质网应激相关蛋白的表达

弃小室内培养液,用4℃预冷的磷酸盐缓冲液洗涤3次,加入含1%蛋白酶/磷酸酶抑制剂的细胞裂解液,冰上裂解30 min,离心后吸取蛋白上清液用BCA法进行蛋白定量。将提取的蛋白上清以4:1的比例与5 $\times$ 上样缓冲液混匀,95℃金属浴10 min进行蛋白变性。蛋白上样量为10~20 μ g,行SDS-PAGE电泳,电泳完成后将蛋白转膜至PVDF膜上。含5%牛血清白蛋白的TBST溶液室温摇床封闭1 h,一抗4℃孵育过夜。TBST室温摇床充分洗涤PVDF膜3~4次,每次10 min。辣根过氧化物酶标记二抗室温摇床孵育1 h后,TBST洗涤PVDF膜3~4次,每次10 min。将ECL试剂盒中的A液与B液按1:1比例混匀,并将PVDF膜与ECL反应液充分接触,PVDF膜沥干后放入点化学发光成像仪进行化学显影。用ImageJ软件对蛋白条带进行灰度值分析,磷酸化蛋白为相对于总蛋白的表达水平,非磷酸化蛋白为相对于内参蛋白的表达水平。

1.5 统计学方法

采用GraphPad Prism 8.0软件进行统计分析。计量数据以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用独立样本 t 检验, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 二甲双胍减轻结肠炎肠上皮细胞凋亡

模型对照组和二甲双胍组细胞凋亡率分别为(14.22 $\pm$ 2.34)%和(9.88 $\pm$ 0.61)%,差异有统计学意义($t=3.119$, $P < 0.05$),见图1。结果提示,二甲双胍可在一定程度上减轻结肠炎肠上皮细胞凋亡。

2.2 二甲双胍上调结肠炎细胞紧密连接蛋白的表达

模型对照组紧密连接蛋白1和密封蛋白1相对表达量分别为0.481 $\pm$ 0.066和0.369 $\pm$ 0.093,二甲双胍组紧密连接蛋白1和密封蛋白1相对表达量分别为0.775 $\pm$ 0.092和0.582 $\pm$ 0.046,差异有统计学意义($t=5.172$ 和3.546,均 $P < 0.05$),见图2。结果提示,二甲双胍可上调结肠炎肠上皮细

图1 模型对照组和二甲双胍组结肠炎肠上皮细胞凋亡流式细胞图

Figure 1 The flow cytometry analysis of intestinal epithelial cell apoptosis in model group and metformin group

图2 模型对照组和二甲双胍组紧密连接蛋白1和密封蛋白1表达电泳图

Figure 2 Electrophoregrams of tight junction proteins in model group and metformin group

胞紧密连接蛋白的表达。

2.3 二甲双胍抑制内质网应激诱导的凋亡通路

与模型对照组比较,二甲双胍组GRP78和CHOP表达水平降低,PERK和eIF2 α 的磷酸化水平降低(均 $P<0.05$),可见PERK-eIF2 α -ATF4-CHOP信号通路被抑制。同时,二甲双胍组caspase-12表达水平也降低($P<0.05$)。见图3和表1。结果提示,二甲双胍可能通过抑制结肠炎肠上皮细胞内质网应激从而减轻肠上皮细胞凋亡,增强肠上皮屏障。

3 讨论

针对UC传统治疗方法存在维持缓解效果差、激素依赖或抵抗、长期用药不良反应等诸多问题,寻找有效治疗UC的药物是目前的研究热点。二甲双胍作为胰岛素增敏剂,不仅有降血糖功能,还具有抗炎、抗衰老及降低血脂的作用^[7,9-10]。本文资料显示,二甲双胍可以减轻肠上皮细胞凋亡、增强紧密连接蛋白,从而改善结肠炎肠上皮屏障损伤,其机制可能与抑制内质网应激诱导的凋

亡信号通路有关。

肠道黏膜屏障功能损伤与UC的发生发展密切相关^[18]。肠道黏膜上皮屏障包括肠上皮细胞和细胞间连接复合物(包括紧密连接等)。紧密连接蛋白主要由细胞膜蛋白闭合蛋白、密封蛋白和细胞质蛋白紧密连接蛋白1组成^[19]。UC患者肠道上皮中紧密连接蛋白1、闭合蛋白的表达水平较健康对照者降低^[20]。既往在结肠炎小鼠和细胞模型中的研究发现,二甲双胍

能够上调紧密连接蛋白的表达,增强肠道黏膜屏障,其机制可能是缘于AMP活化蛋白激酶信号通路的激活^[11-12]。Pandey等^[16]通过醋酸诱导的结肠炎大鼠模型发现,二甲双胍可以剂量依赖性地减轻结肠黏膜损伤,其机制可能是抑制促炎介质的释放以及降低环氧合酶2、诱生型一氧化氮合酶

GRP:葡萄糖调节蛋白;PERK:蛋白激酶R样内质网激酶;eIF2 α :真核生物起始因子2 α ;CHOP:C/EBP同源蛋白;caspase:胱天蛋白酶。

图3 模型对照组和二甲双胍组内质网应激相关蛋白表达电泳图

Figure 3 Electrophoregrams of endoplasmic reticulum stress associated proteins in model group and metformin group

表 1 模型对照组和二甲双胍组内质网应激相关蛋白表达量比较
Table 1 Expression of endoplasmic reticulum stress associated proteins in model group and metformin group

组 别	n	GRP78	CHOP	caspase-12	磷酸化PERK/PERK	磷酸化eIF2α/eIF2α
模型对照组	3	1.145 ± 0.048	1.127 ± 0.061	1.173 ± 0.076	0.822 ± 0.012	0.818 ± 0.057
二甲双胍组	3	0.925 ± 0.138	0.760 ± 0.148	0.985 ± 0.045	0.650 ± 0.065	0.568 ± 0.126
t值	—	3.018	4.586	3.691	5.197	3.618
P值	—	<0.05	<0.01	<0.05	<0.05	<0.05

“—”：无相关数据。GRP：葡萄糖调节蛋白；CHOP：C/EBP同源蛋白；caspase：胱天蛋白酶；PERK：蛋白激酶R样内质网激酶；eIF2α：真核生物起始因子2α。

和核因子κB的表达。另有研究发现,使用二甲双胍可降低2型糖尿病患者罹患炎症性肠病的风险^[21]。本文资料显示,二甲双胍可以通过减轻结肠炎肠上皮细胞的凋亡、上调紧密连接蛋白表达水平从而增强肠道黏膜上皮屏障。

内质网应激与UC的发生发展密切相关^[6]。本文资料显示,二甲双胍作用后内质网分子伴侣GRP78的表达下降,表明二甲双胍抑制了内质网应激。CHOP是PERK和eIF2α磷酸化级联的下游分子。活化的PERK可以磷酸化eIF2α,并上调CHOP的表达,而CHOP是调节死亡受体5表达的转录因子,与内质网应激诱导的细胞凋亡有关^[22]。研究发现,炎症性肠病患者肠道黏膜中CHOP表达增强^[23]。caspase-12是一种位于内质网中的半胱氨酸蛋白酶^[24],可以被过强的内质网应激激活,再激活下游的caspase-9和caspase-3,最终导致细胞凋亡^[25]。本文资料显示,二甲双胍作用后CHOP和caspase-12表达水平下降,PERK和eIF2α的磷酸化水平降低,表明二甲双胍抑制了内质网应激诱导的凋亡通路。以上结果提示,二甲双胍可能通过抑制PERK-eIF2α-ATF4-CHOP信号通路,减轻内质网应激诱导的凋亡,从而增强结肠炎黏膜上皮屏障。

综上所述,二甲双胍可以通过减轻肠上皮细胞凋亡和增加紧密连接蛋白表达从而改善结肠炎肠道上皮屏障,其分子机制可能与抑制内质网应激诱导的细胞凋亡途径有关。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

[1] PETERSON L W, ARTIS D. Intestinal epithelial cells: regulators of barrier function and immune homeostasis[J]. *Nat Rev Immunol*, 2014, 14(3):

141-153.
[2] NG S C, SHI H Y, HAMIDI N, et al. Worldwide incidence and prevalence of inflammatory bowel disease in the 21st century: a systematic review of population-based studies[J]. *Lancet*, 2017, 390(10114): 2769-2778.
[3] HIRTEN R P, SANDS B E. New therapeutics for ulcerative colitis[J]. *Annu Rev Med*, 2021, 72(1): 199-213.
[4] MA X S, DAI Z L, SUN K J, et al. Intestinal epithelial cell endoplasmic reticulum stress and inflammatory bowel disease pathogenesis: an update review[J]. *Front Immunol*, 2017, 8: 1271.
[5] EUGENE S P, REDDY V S, TRINATH J. Endoplasmic reticulum stress and intestinal inflammation: a perilous union[J]. *Front Immunol*, 2020, 11: 543022.
[6] KASER A, BLUMBERG R S. Endoplasmic reticulum stress in the intestinal epithelium and inflammatory bowel disease[J]. *Semin Immunol*, 2009, 21(3): 156-163.
[7] BAI B, CHEN H B. Metformin: a novel weapon against inflammation[J]. *Front Pharmacol*, 2021, 12: 622262.
[8] CHEN Y C, LI H, WANG J. Mechanisms of metformin inhibiting cancer invasion and migration[J]. *Am J Transl Res*, 2020, 12(9): 4885-4901.
[9] SOUKAS A A, HAO H, WU L. Metformin as anti-aging therapy: is it for everyone?[J]. *Trends Endocrinol Metab*, 2019, 30(10): 745-755.
[10] HE L. Metformin and systemic metabolism[J]. *Trends Pharmacol Sci*, 2020, 41(11): 868-881.
[11] CHEN L, WANG J, YOU Q, et al. Activating AMPK to restore tight junction assembly in intestinal epithelium and to attenuate experimental colitis by metformin[J]. *Front Pharmacol*, 2018, 9: 761.
[12] DENG J, ZENG L, LAI X, et al. Metformin protects against intestinal barrier dysfunction via AMPKα1-dependent inhibition of JNK signalling activation[J]. *J Cell Mol Med*, 2018, 22(1): 546-557.
[13] DI FUSCO D, DINALLO V, MONTELEONE I, et al. Metformin inhibits inflammatory signals in the gut by

- controlling AMPK and p38 MAP kinase activation[J]. **Clin Sci**, 2018, 132(11): 1155-1168.
- [14] EL-MAHDY N A, EL-SAYAD M E S, EL-KADEM A H, et al. Metformin alleviates inflammation in oxazolone induced ulcerative colitis in rats: plausible role of sphingosine kinase 1/sphingosine 1 phosphate signaling pathway[J]. **Immunopharmacol Immunotoxicol**, 2021, 43(2): 192-202.
- [15] LIU X, SUN Z, WANG H. Metformin alleviates experimental colitis in mice by up-regulating TGF- β signaling[J]. **Biotech Histochem**, 2021, 96(2): 146-152.
- [16] PANDEY A, VERMA S, KUMAR V L. Metformin maintains mucosal integrity in experimental model of colitis by inhibiting oxidative stress and pro-inflammatory signaling[J]. **Biomed Pharmacother**, 2017, 94: 1121-1128.
- [17] REN M T, GU M L, ZHOU X X, et al. Sirtuin 1 alleviates endoplasmic reticulum stress-mediated apoptosis of intestinal epithelial cells in ulcerative colitis[J]. **World J Gastroenterol**, 2019, 25(38): 5800-5813.
- [18] VAN DER POST S, JABBAR K S, BIRCHENOUGH G, et al. Structural weakening of the colonic mucus barrier is an early event in ulcerative colitis pathogenesis[J]. **Gut**, 2019, 68(12): 2142-2151.
- [19] PARADIS T, BÈGUE H, BASMACIYAN L, et al. Tight junctions as a key for pathogens invasion in intestinal epithelial cells[J]. **Int J Mol Sci**, 2021, 22(5): 2506.
- [20] TAN Y, GUAN Y, SUN Y, et al. Correlation of intestinal mucosal healing and tight junction protein expression in ulcerative colitis patients[J]. **Am J Med Sci**, 2019, 357(3): 195-204.
- [21] TSENG C H. Metformin use is associated with a lower risk of inflammatory bowel disease in patients with type 2 diabetes mellitus[J]. **J Crohns Colitis**, 2021, 15(1): 64-73.
- [22] LU M, LAWRENCE D A, MARSTERS S, et al. Opposing unfolded-protein-response signals converge on death receptor 5 to control apoptosis[J]. **Science**, 2014, 345(6192): 98-101.
- [23] KASER A, LEE A H, FRANKE A, et al. XBP1 links ER stress to intestinal inflammation and confers genetic risk for human inflammatory bowel disease[J]. **Cell**, 2008, 134(5): 743-756.
- [24] YONEDA T, IMAIZUMI K, OONO K, et al. Activation of caspase-12, an endoplasmic reticulum (ER) resident caspase, through tumor necrosis factor receptor-associated factor 2-dependent mechanism in response to the ER stress[J]. **J Biol Chem**, 2001, 276(17): 13935-13940.
- [25] IURLARO R, MUÑOZ-PINEDO C. Cell death induced by endoplasmic reticulum stress[J]. **FEBS J**, 2016, 283(14): 2640-2652.

[本文编辑 沈 敏 余 方]

· 学术动态 ·

高建青教授团队构建氧化铁纳米粒增强的干细胞载体系统 实现脑胶质瘤的高效靶向自杀基因治疗

2021年7月13日,《治疗诊断学》(Theranostics)在线发表了浙江大学药学院高建青教授团队的最新研究成果“*Iron oxide nanoparticles promote Cx43-overexpression of mesenchymal stem cells for efficient suicide gene therapy during glioma treatment*”(https://doi.org/10.7150/thno.60160)。该研究成功制备了一种基于氧化铁纳米粒增强的间充质干细胞(MSCs)载体系统,不但实现了自杀基因向脑胶质瘤组织的高效靶向递送,还能通过氧化铁纳米粒增强MSCs与胶质瘤细胞间的间隙连接通信,显著提高胶质瘤细胞对旁观者杀伤效应的敏感性,最终实现良好的抑瘤效果。

研究人员针对当前基于MSCs的细胞载体系统用于脑胶质瘤治疗的不足,通过氧化铁纳米粒携带自杀基因对MSCs载体进行改良,最终实现了MSCs载体对自杀基因(疱疹病毒胸苷激酶)的高效携带和向胶质瘤组织的靶向递送。研究进一步发现,氧化铁纳米粒能上调MSCs的细胞间隙连接蛋白43表达,并可以进一步影响与MSCs接触的胶质瘤细胞上的该蛋白表达,促进MSCs与胶质瘤细胞间的间隙连接通信,提高自杀基因疗法旁观者效应的杀伤效率。

李艾硕士研究生和张添源博士为论文第一作者。该研究得到了国家自然科学基金、中国博士后科学基金以及浙江省“万人计划”等资助。