

• 论 著 •

基于 RNA 测序的 *SMN1* 基因缺失型脊髓性肌肉萎缩症的可变剪接差异性分析*

林炎鸿¹, 张梦雅², 曾 健^{1△}

1. 厦门大学附属东方医院(联勤保障部队第九〇〇医院)基础医学实验室/福建省移植生物学重点实验室, 福建福州 350025; 2. 福建医科大学福总临床医学院(联勤保障部队第九〇〇医院)基础医学实验室, 福建福州 350025

摘 要:目的 通过分析运动神经元生存基因 1(*SMN1*) 基因纯合性缺失型儿童进行性脊髓性肌肉萎缩症(SMA)患者和 *SMN1* 基因拷贝数正常对照外周血淋巴细胞表达谱, 研究 *SMN1* 基因缺失对可变剪接的影响。方法 利用转录组测序对患者组与正常对照组进行表达谱测序, 用 rMATS 软件对 RNA-seq 数据进行可变剪接事件差异分析, 筛选出患者组与正常对照组中差异的外显子跳跃和内含子保留事件, 通过在线工具 NovoMagic v3.0 对这些差异可变剪接体进行基因功能和代谢通路富集分析, 实现个性化分析和作图, 同时用 NCBI 数据库对这些基因进行注释。结果 (1) *SMN1* 基因纯合性缺失可导致外周血淋巴细胞 mRNA 可变剪接及其表达量发生变化; (2) 外显子跳跃差异基因主要影响核糖核蛋白组装、胞内转运、翻译、乙酰化修饰、线粒体能量代谢及泛素化调控的降解通路; (3) 内含子保留差异基因除参与泛素化调控、内吞、翻译、线粒体能量代谢外, 同时还调节细胞骨架和代谢酶活性相关乙酰化修饰。结论 *SMN1* 基因纯合性缺失能够改变部分基因的可变剪接, 进而影响相关蛋白的合成、组装和降解, 最终导致蛋白质稳态失衡, 为 SMA 的发病机制提供新的线索。

关键词:运动神经元生存基因 1 纯合性缺失; 外周血; RNA 测序; 可变剪接; 内含子保留; 外显子跳跃

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2021.23.009

中图法分类号:R446.1

文章编号:1673-4130(2021)23-2861-05

文献标志码:A

Analysis of the difference of alternative splicing in *SMN1* gene deletion type spinal muscular atrophy based on RNA sequencing*

LIN Yanhong¹, ZHANG Mengya², ZENG Jian^{1△}

1. Laboratory of Basic Medicine, Dongfang Hospital (900TH Hospital of Joint Logistics Support Force), Xiamen University/Fujian Provincial Key Laboratory of Transplant Biology, Fuzhou, Fujian 350025, China; 2. Laboratory of Basic Medicine, Fuzong Clinical Medical College of Fujian Medical University (900TH Hospital of Joint Logistics Support Force), Fuzhou, Fujian 350025, China

Abstract: **Objective** The effect of motor neuron survival gene 1 (*SMN1*) deletion on alternative splicing was studied by analyzing the expression profile of peripheral blood lymphocytes in the homozygous deletion children with progressive spinal muscular atrophy (SMA) and normal *SMN1* gene copy number. **Methods** Used transcriptome sequencing to sequence the expression profile of the patient group and the normal control group. Used rMATS software to analyze the difference of alternative splicing events on RNA-seq data, and screen out the different exon skipping and intron retention events between the patient group and the normal control group. Used the online tool NovoMagic v3.0 to perform gene function and metabolic pathway enrichment analysis of these differential alternative spliceosomes to achieve personalized analysis and mapping. At the same time, the NCBI database was used to annotate these genes. **Results** (1) Homozygous deletion of *SMN1* gene could lead to peripheral blood lymphocyte mRNA alternative splicing and its expression changed; (2) Exon skipping differential genes mainly affected ribonucleoprotein assembly, intracellular transport, translation, acetylation modification, mitochondrial energy metabolism and ubiquitin-regulated degradation path-

* 基金项目:福建省自然科学基金面上项目(2018J01230、2018J01341)。

作者简介:林炎鸿,女,技师,主要从事遗传病分子诊断和产前诊断方面的研究。△ 通信作者, E-mail: zengjian1980222@163.com。

本文引用格式:林炎鸿,张梦雅,曾健. 基于 RNA 测序的 *SMN1* 基因缺失型脊髓性肌肉萎缩症的可变剪接差异性分析[J]. 国际检验医学杂志, 2021, 42(23): 2861-2865.

way. (3) Differential genes with intron retention not only participated in ubiquitin regulation, endocytosis, translation and mitochondrial metabolism, but also regulated acetylation modification related to cytoskeleton and metabolic enzyme activity. **Conclusion** SMN1 gene homozygous deletion could change the alternative splicing of some genes, and then affect synthesis, assembly and degradation of related proteins, resulting in protein homeostasis imbalance. This provides a new clue to the pathogenesis of SMA.

Key words: homozygous deletion of motor neuron survival gene 1; peripheral blood; RNA sequencing; alternative splicing; intron retention; exon skipping

儿童进行性脊髓性肌肉萎缩症(SMA)是一种以脊髓前角运动神经元退行性病变为主要特征的常染色体隐性遗传病,该病的疾病基因为运动神经元生存基因 1(SMN1),位于 5 号染色体长臂 1 区 3 带,含 9 个外显子(1、2a、2b、3~8)。修饰基因 SMN2 与 SMN1 高度同源:在编码区只有 1 个碱基的差别^[1]。有研究表明,约 95% 的 SMA 患者 SMN1 基因存在纯合性缺失^[1]。全长 SMN 蛋白由 294 个氨基酸残基组成,其相对分子质量为 38×10^3 ,主要由 SMN1 基因编码。SMA 患者的临床严重程度与 SMN 蛋白水平存在密切相关性。有研究表明,SMN 蛋白在真核生物中广泛表达,并参与了多种细胞的生物学过程^[1]。最早并被深入研究的是 SMN 蛋白在小核核糖核蛋白(snRNP)组装过程中的功能。snRNP 的正确组装是 RNA 剪接复合体形成的必要前提。然而,关于 SMN 蛋白依赖的 snRNP 的组装及剪接缺陷是否与 SMA 的表型相关仍不清楚。另外,有研究发现,在小鼠和斑马鱼的 SMA 模型中,部分基因发生了剪接异常^[2-3]。SMN 蛋白缺陷是否会引起广泛性的剪接异常或造成某些关键基因或重要信号通路的可变剪接异常,从而导致 SMA 发生? 本文通过分析 SMN1 基因纯合性缺失型患者与 SMN1 基因拷贝数正常对照组外周血淋巴细胞表达谱,初步研究 SMN 蛋白对相关基因可变剪接的影响,并分析差异可变剪接参与的生物学过程及代谢通路,为全面了解 SMN 蛋白的生理功能和 SMA 的发病机制提供线索。

1 资料与方法

1.1 一般资料 SMA 患者组 5 例(BR1、BR2、BR3、BR4、BR5),其中男 4 例,女 1 例,年龄 1~23 岁。SMA 患者纳入标准:(1)符合 SMA 临床诊断标准;(2)SMN1 基因检测结果显示纯合性缺失。正常对照组 5 例(ZC1、ZC2、ZC3、ZC4、ZC5),纳入标准为 SMN1 基因拷贝数为 2。采用 Trizol(美国 Invitrogen 公司)法提取总 RNA,−80 °C 冰箱保存,用于后续 RNA 测序。样品交由基于 Illumina 测序平台的北京诺禾致源科技股份有限公司进行建库和测序。本研究通过联勤保障部队第九〇〇医院医学伦理委员会批准,取材前受试者或其监护人均签署知情同意书。

1.2 差异可变剪接的识别 对测序获得的原始序列数据进行过滤,即去除少量带有测序接头、去除含 N

(N 表示无法确定碱基信息)及测序质量较低的 reads,再检查测序错误率及 GC 含量分布情况,以获得后续分析所需要的 clean reads。使用 HISAT2 软件将 clean reads 与参考基因组进行快速精确的比对,获取 clean reads 在参考基因组上的定位信息^[4],通过分析比对结果,寻找外显子间的结合位点。对 RNA-seq 的基因表达值先后对测序深度和基因长度进行校正,并用 FPKM 表示。使用 rMATS 软件对可变剪接事件进行相关定量及差异分析,对有生物学重复的样品行差异可变剪接分析^[5]。每个可变剪接事件分别对应 2 个剪接异构体,分别对其进行表达量统计,并通过校正得到表达量,然后再计算外显子保留剪接体在 2 个剪接体总表达量中的比值,比值即为结果文件中的患者组和正常对照组,最后行差异显著性分析($FDR < 0.05$),从而筛选新引入和缺失的可变剪接。

1.3 可变剪接显著差异基因的基因功能(GO)和代谢通路(KEGG)分析 主要分析外显子跳跃(SE)和内含子保留(RI)剪接变异事件。采用 clusterProfiler 软件对差异显著的 SE 和 RI 基因行 GO 和 KEGG 富集分析注释^[6],以发现相关基因参与的生物学过程和代谢通路。

1.4 统计学处理 先对原始 read count 进行标准化和对测序深度的校正,然后通过统计学模型等方法行多重假设检验校正,得到 FDR 值。GO 富集和 KEGG 富集均以 $P < 0.05$ 作为差异富集的阈值。

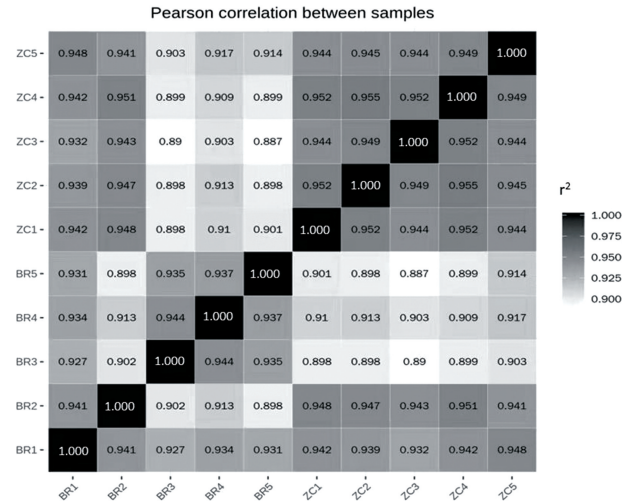
2 结果

根据各样本所有基因的 FPKM 值计算组内及组间样本的相关系数(r^2),结果显示,组内样本间的 r^2 均大于 0.9(图 1),提示实验的生物学重复性满足后续的分析要求。

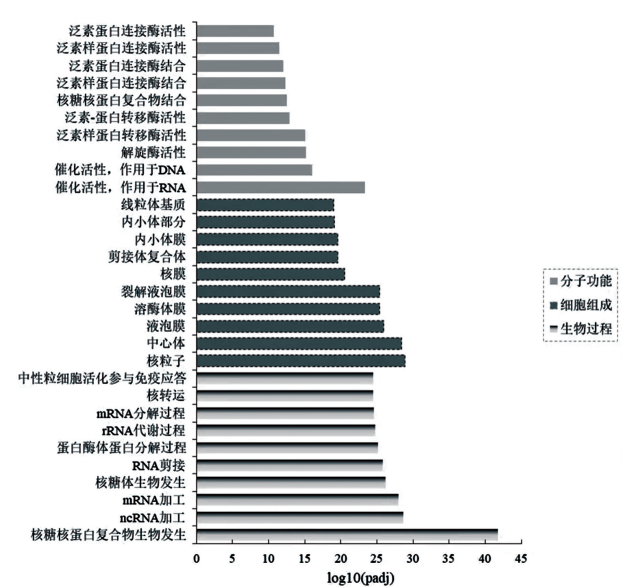
2.1 差异可变剪接基因的识别 发生 SE 类型可变剪接事件的基因数为 11 677 个,其中显著性差异基因数为 218 个($FDR < 0.05$);发生 RI 类型可变剪接事件的基因数为 2 576 个,其中显著性差异基因数为 54 个($FDR < 0.05$)。

2.2 显著差异可变剪接的 GO 注释 差异 SE 基因的 GO 注释主要富集于核糖核蛋白复合物生物发生、各类 RNA(如 ncRNA、mRNA、rRNA)的处理、剪接和代谢过程及核转运的生物过程;细胞组分的定位主要在核孔、中心体、各类运输泡膜、剪接体复合物和线

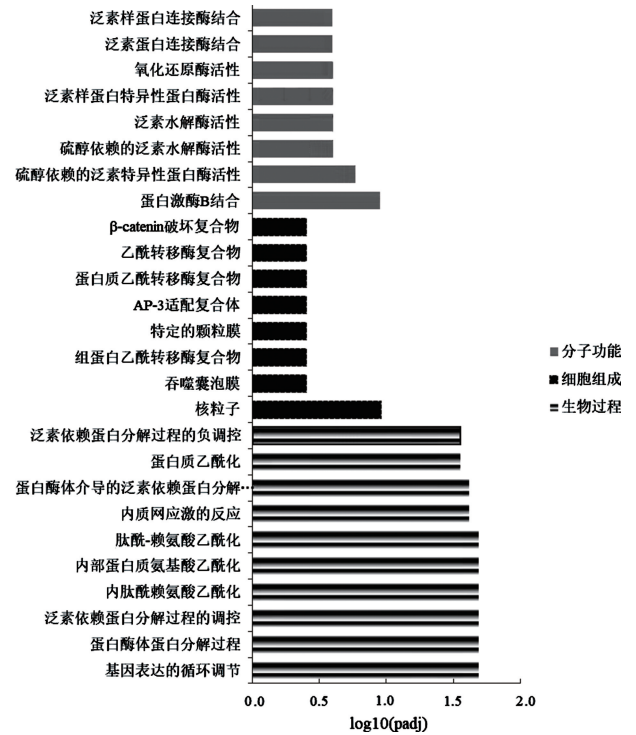
粒体基质中;其主要分子功能为 RNA/DNA 催化活性、泛素相关酶活性及核糖核蛋白复合物结合活性(图 2)。以上数据提示 SMN 蛋白对 SE 基因可变剪接的影响主要存在 4 个方面:(1)核糖核蛋白组装;(2)胞内转运和翻译;(3)线粒体稳态维持;(4)与泛素-降解通路。图 3 显示差异 RI 基因主要富集的生物学过程为基因表达的调节、泛素依赖蛋白分解调控及乙酰化调控等生物过程。细胞组分的定位主要在囊泡膜和蛋白乙酰转移酶复合物等,其主要分子功能为蛋白激酶 B 结合活性、泛素特异性蛋白酶/水解酶/连接酶活性和氧化还原酶活性等。以上数据提示 SMN 蛋白对 RI 基因可变剪接的影响主要存在 4 个方面:(1)蛋白/氨基酸乙酰化调控;(2)泛素-降解通路;(3)基因表达;(4)与线粒体稳态维持。



注:图中横、纵坐标为各样本相关系数的平方(r^2)。
图 1 样本间相关性热图



注:图中纵坐标为 GO 注释的事件,横坐标为 GO Term 富集的显著性水平,用 $\log_{10}(\text{padj})$ 表示,不同的灰度分别表示不同的功能分类。
图 2 SMA 患者组与正常对照组发生显著差异 SE 基因的 GO 注释



注:图中纵坐标为 GO 注释的事件,横坐标为 GO Term 富集的显著性水平,用 $\log_{10}(\text{padj})$ 表示,不同的灰度分别表示不同的功能分类。
图 3 SMA 患者组与正常对照组发生显著差异 RI 基因的 GO 注释

2.3 差异可变剪接的代谢通路分析 结果分析显示,差异 SE 基因主要富集在 Apelin 信号通路、自噬、剪接体和腺苷酸激活蛋白激酶 (AMPK) 信号通路。富集在剪接体代谢通路中的有丝氨酸/富含精氨酸的剪接因子 *SRSF1* 和 *SRSF7*,广泛参与剪接过程的活化。*SRSF1* 基因位于 17 号染色体上,与正常对照组比较,患者组样本中该基因在基因组负链坐标 58005801 至 58005041 的区域出现了差异剪接,即 SE,该剪接事件呈现显著性增加。*SRSF7* 基因位于 2 号染色体上,与正常对照组比较,患者组样本中该基因在基因组负链坐标 38747062 至 38746747 的内含子区域出现了差异剪接,即患者组主要是以该区域内含子剪接方式为主,而正常对照组在该基因中则是以基因组负链坐标 38748056 至 38746747 的区域 SE 剪接模式为主,两组呈现显著性差异。富集在 Apelin 信号通路、自噬和 AMPK 信号通路上的磷脂酰肌醇激酶相关激酶家族有 *MTOR* 基因,主要参与细胞生长、分化、增殖和自噬等。*MTOR* 基因位于 1 号染色体上,与正常对照组比较,患者组样本中该基因在基因组负链坐标 11258485 至 11256192 的区域出现了差异剪接,即 SE,在基因组负链坐标 11256933 至 11256192 的区域出现了剪接事件显著性增加。富集在自噬通路上的还有 *BECN1* 基因,主要参与自噬的调节,在发育、肿瘤发生和神经退行性变中起重要作用。*BECN1* 基因位于 17 号染色体上,与正常对照组比较,患者组样本中该基因在基因组负链坐标

42814524 至 42810928 的区域出现了差异剪接,即 SE,该剪接事件呈现显著性增加。差异 RI 基因主要富集的通路在剪接体代谢和泛素化通路。富集在剪接体代谢通路中的 *SRSF1* 和 *SRSF5*,后者参与特异基因的可变剪接调控,进而参与细胞凋亡等多种生理过程。

3 讨 论

SMN1 基因缺失引起的 SMN 蛋白缺乏是导致 SMA 的直接原因。SMN 蛋白在真核生物的组织 and 细胞中广泛表达,作为核糖核蛋白复合物的的重要组成部分,在剪接体的组装和核糖核酸蛋白的生物发生过程中发挥关键作用。近年有研究提示,SMN 蛋白可能还参与了其他重要的生理过程,包括 mRNA 的翻译和局部翻译、细胞骨架动力学、内吞和自噬等^[7]。本研究基于 RNA 测序对患者组与正常对照组外周血淋巴细胞表达谱进行可变剪接分析,结果提示,*SMN1* 基因缺失能够改变部分基因的可变剪接,进而影响相关蛋白的合成、组装和降解,最终导致蛋白稳态失衡。基于本研究数据,SMN 蛋白在蛋白稳态维持中的功能主要体现在 snRNP 组装与 RNA 剪接、mRNA 的定位和翻译、生物能量和线粒体稳态、自噬、泛素依赖的降解通路,以及调节代谢通路及代谢酶活性乙酰化修饰。

有研究表明,SMN 蛋白通过与 Gemin 2~8 和 Unrip 等 8 个蛋白紧密结合,形成一个大分子复合物,即 SMN 复合体,定位在细胞质和胞浆中^[7]。SMN 复合体在 snRNP 的组装和核内运输过程中充当分子开关的角色,进而在后续的剪接体组装和 RNA 剪接中发挥重要作用^[8]。本研究通过可变剪接分析筛选出显著差异 SE 事件与核糖核蛋白复合物生物发生、RNA 剪接及核转运的生物过程有关的主要基因有 *SRSF1*、*SRSF5*。其中 *SRSF1* 编码富含精氨酸/丝氨酸的剪接因子蛋白家族成员,该蛋白的磷酸化状态和与它相互作用的蛋白决定了是可以激活还是抑制剪接。*SRSF5* 编码的蛋白是富含丝氨酸/精氨酸的前 mRNA 剪接因子家族成员,该家族构成剪接体的一部分,这些因子中的每一个都包含一个用于结合 RNA 的 RNA 识别基序和一个用于结合其他蛋白质的 RS 结构域。RS 结构域富含丝氨酸和精氨酸残基,促进不同精氨酸剪接因子之间的相互作用。除了对 mRNA 剪接起关键作用外,精氨酸蛋白还被证明参与了核内 mRNA 的输出和翻译,这些数据提示 SMN 蛋白对 SE 可变剪接基因的影响更多地集中在 snRNP 和剪接体的组装调控过程。

近年来的研究显示,SMN 蛋白还与 mRNA 结合蛋白相互作用,并促进它们组装成 mRNP 运输颗粒^[8],进而调节 mRNA 的定位和局部翻译^[9-10]。同时有研究还发现,SMN 蛋白也存在于轴突和树突中,在

神经元发育或修复过程中对神经元 mRNA-蛋白质复合体的形成有重要作用^[11]。本研究的差异可变剪接数据也提示,SMN 蛋白的缺失可影响 mRNA 的加工代谢和核糖体的生物合成过程,主要差异基因包括 *MTOR*、*TCS1*、*SRSF1* 等,其中 *MTOR* 基因是一个重要的真核细胞信号基因,编码的蛋白属于磷脂酰肌醇激酶相关激酶家族,该信号参与免疫抑制,影响转录和蛋白质合成,进而调节细胞的生长、凋亡和自噬等^[12]。体内试验提示,在小鼠模型来源的神经元和患病者来源的成纤维细胞中 SMN 蛋白可能通过 mTOR 信号通路调控局部蛋白的合成^[13]。*TSC1* 基因编码生长抑制蛋白 Hamartin,该蛋白与 GTPase 激活蛋白 tuberin 相互作用并稳定,负性调节哺乳动物雷帕霉素复合体靶点 1(mTORC1)信号,从而阻止相关激酶的泛素化和蛋白酶体降解^[14]。结合文献报道及本研究数据推测,SMN 蛋白可能通过以下几种机制调控蛋白翻译:(1)神经元中 mRNA 的亚细胞定位;(2)与核糖体的结合进而控制局部翻译所需的核糖体单位;(3)mTOR 信号的调控。对于 SMN 蛋白如何通过 mTOR 的信号调控从而在 SMA 的发生中发挥作用,亟待进一步深入研究。

除了上述 snRNP 组装、mRNA 的定位和翻译等蛋白合成通路外,蛋白清除/降解通路也是蛋白稳态维持的重要机制。真核生物的蛋白降解清除机制主要有两种途径,即泛素依赖的蛋白酶体系统/溶酶体蛋白水解及自噬。本研究 SMN 蛋白对 SE 和 RI 可变剪接影响均指向自噬和泛素-降解通路,这些基因包括 *GABARAPL1*、*BECN1* 等,其中 *GABARAPL1* 基因是雌激素诱导的早期基因,编码从线虫到人类高度保守的蛋白质,是正常自噬通量所必需的^[15]。*BECN1* 基因位于染色体 17q21 上,参与自噬的调节,在发育、肿瘤发生和神经退行性变中起重要作用^[16-17]。

本研究还提示,SMN 蛋白的缺失影响了线粒体稳态维持和能量代谢相关的基因可变剪接,主要基因有 *GABARAPL1*、*MCL1*,其中 *GABARAPL1* 基因也参与细胞能量代谢的调控,包括基础耗氧速率、细胞内三磷酸腺苷、总谷胱甘肽和受损线粒体体积聚等^[15]。*MCL1* 基因是在人髓系白血病细胞系分化过程中发现的早期诱导基因,可能通过不同的剪接机制和所产生的基因产物的相互作用来调节细胞生长状态^[18]。近期有研究提示,在 SMN 蛋白缺失的小鼠模型中神经元的线粒体功能缺陷,包括线粒体代谢的基础和最大呼吸指标异常、受损的线粒体膜容受性、线粒体动力学异常改变等^[19]。当然 SMN 蛋白在线粒体稳态维持和能量代谢中的作用机制还需进一步阐明。

本研究发现,*SMN1* 基因的缺失可导致乙酰化修

饰相关的基因发生 RI 可变剪接差异。乙酰化是改变蛋白功能最主要的修饰方式之一。目前有研究提示,乙酰化修饰功能除了影响细胞染色体结构及对核内转录调控因子的激活方面外,还参与调节代谢通路及代谢酶的活性^[20],为 SMA 的发病机制提供了新的线索。

本研究通过对 *SMN1* 基因缺失型 SMA 患者外周血淋巴细胞的可变剪接分析提示,SMN 蛋白缺陷能够改变部分基因的可变剪接,这些基因主要参与 snRNP 组装与 RNA 剪接、mRNA 的定位和翻译、生物能量和线粒体稳态、自噬、泛素依赖的降解通路,以及调节代谢通路及代谢酶活性乙酰化修饰,进而影响相关蛋白的合成、组装和降解,最终导致蛋白稳态失衡,为 SMA 的发病机制提供新的线索。下一步将通过体外和体内试验对其中关键基因的生物学功能进行深入研究,以期有新的发现。

参考文献

- [1] 曾健,林炎鸿,严爱贞,等.一例脊肌萎缩症患者及其家系的 SMN 基因突变分析[J].中华医学遗传学杂志,2009,26(2):139-143.
- [2] CUSTER S,GILSON T,LI H,et al. Altered mRNA splicing in SMN-depleted motor neuron-like cells[J]. PLoS One,2016,11(10):e0163954.
- [3] LOTTI F,IMLACH W,SAIEVA L,et al. An SMN-dependent U12 splicing event essential for motor circuit function[J]. Cell,2012,151(2):440-454.
- [4] FONSECA N,MARIONI J,BRAZMA A. RNA-Seq gene profiling: a systematic empirical comparison [J]. PLoS One,2014,9(9):e107026.
- [5] SHEN S,PARK J,LU Z,et al. rMATS:robust and flexible detection of differential alternative splicing from replicate RNA-Seq data[J]. Proc Nati Acad Sci U S A,2014,111(51):5593-5601.
- [6] YU G,WANG L G,HAN Y,et al. Cluster Profiler:an R package for comparing biological themes among gene clusters[J]. OMICS,2012,16(5):284-287.
- [7] CHAYTOW H,HUANG Y T,GILLINGWATER T H,et al. The role of survival motor neuron protein (SMN) in protein homeostasis[J]. Cell Mol Life Sci,2018,75(21):3877-3894.
- [8] PRICE P L,MORDERER D,ROSSOLL W. RNP assembly defects in spinal muscular atrophy[J]. Adv Neurobi-

- ol,2018,20:143-171.
- [9] COADY T H,LORSON C L. SMN in spinal muscular atrophy and snRNP biogenesis [J]. Wiley Interdiscip Rev RNA,2011,2(4):546-564.
- [10] DONLIN-ASP P G,FALLINI C,CAMPOS J,et al. The survival of motor neuron protein acts as a molecular chaperone for mRNP assembly [J]. Cell Rep,2017,18(7):1660-1673.
- [11] BEATTIE C E,KOLB S J. Spinal muscular atrophy: selective motor neuron loss and global defect in the assembly of ribonucleoproteins [J]. Brain Res,2018,1693(1):92-97.
- [12] THOREEN C,CHANTRANUPONG L,KEYS H,et al. A unifying model for mTORC1-mediated regulation of mRNA translation [J]. Nature,2012,485(7396):109-113.
- [13] KYE M,NIEDERST E,WERTZ M,et al. SMN regulates axonal local translation via miR-183/mTOR pathway [J]. Hum Mol Genet,2014,23(23):6318-6331.
- [14] ZHANG Y,NICHOLATOS J,DREIER J,et al. Coordinated regulation of protein synthesis and degradation by mTORC1 [J]. Nature,2014,513(7518):440-443.
- [15] BEHREND S,SOWA M E,GYGI S P,et al. Network organization of the human autophagy system [J]. Nature,2010,466(7302):68-76.
- [16] ZHONG Y,WANG Q,LI X,et al. Distinct regulation of autophagic activity by atg14L and rubicon associated with beclin 1-phosphatidylinositol-3-kinase complex [J]. Nat Cell Biol,2009,11(4):468-476.
- [17] ASHKENAZI A,BENTO C,RICKETTS T,et al. Polyglutamine tracts regulate beclin 1-dependent autophagy [J]. Nature,2017,545(7652):108-111.
- [18] BAE J,LEO C P,HSU S Y,et al. MCL-1S,a splicing variant of the antiapoptotic BCL-2 family member MCL-1, encodes a proapoptotic protein possessing only the BH3 domain [J]. J Biol Chem,2000,275(33):25255-25261.
- [19] MILLER N,SHI H,ZELIKOVICH A S,et al. Motor neuron mitochondrial dysfunction in spinal muscular atrophy [J]. Hum Mol Genet,2016,25(16):3395-3406.
- [20] WANG Q,ZHANG Y,YANG C,et al. Acetylation of metabolic enzymes coordinates carbon source utilization and metabolic flux [J]. Science,2010,327(5968):1004-1007.

(收稿日期:2021-04-26 修回日期:2021-09-25)