

• 论 著 •

上皮间质转化相关基因水平评估肝癌免疫治疗疗效的应用价值*

韩 雪¹, 李 帅¹, 徐 蓉², 马文静³, 黄国虹^{1△}

新疆维吾尔自治区人民医院:1. 检验科;2. 肿瘤科, 新疆乌鲁木齐 830001;
3. 新疆维吾尔自治区乌鲁木齐市中医医院检验科, 新疆乌鲁木齐 830002

摘要:**目的** 分析上皮间质转化(EMT)相关基因水平评估肝癌免疫治疗效果的应用价值。**方法** 将 2020 年 1 月至 2021 年 1 月于新疆维吾尔自治区人民医院行免疫治疗的 113 例肝癌患者纳入研究,根据患者预后将其分为预后良好组 75 例和预后不良组 32 例。采用酶联免疫吸附试验检测 EMT 相关基因[Snail、Twist、E-钙黏蛋白(E-cadherin)、N-钙黏蛋白(N-cadherin)]水平;采用多因素 Cox 回归分析肝癌免疫治疗效果不佳的影响因素;采用受试者工作特征(ROC)曲线评估 EMT 相关基因对患者免疫治疗疗效的诊断价值;建立患者免疫治疗疗效的列线图模型,并对列线图模型进行内部验证,并用一致性指数(C-index)量化模型预测性能。**结果** 预后良好组患者的 Snail、Twist 及 N-cadherin 水平低于预后不良组(均 $P<0.05$),E-cadherin 水平高于预后不良组($P=0.001$)。多因素 Cox 回归结果显示,Snail、Twist 及 N-cadherin 水平是患者免疫治疗效果不佳的独立危险因素,E-cadherin 水平则是独立保护因素。列线图模型预测患者免疫治疗预后相关 C-index 为 0.923(95%CI 0.876~0.943)。ROC 曲线结果显示,Snail、Twist、E-cadherin、N-cadherin 4 项指标联合预测患者免疫治疗效果不佳的预测效能优于各项指标单独预测(均 $P<0.05$)。**结论** EMT 相关基因水平能有效预测患者免疫治疗预后,有助于早期肝癌患者采取有效干预措施进行治疗。

关键词: 上皮间质转化; 基因表达; 肝癌; 免疫治疗

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2023.23.019 **中图法分类号:**R735.7

文章编号:1673-4130(2023)23-2914-05 **文献标志码:**A

Application value of epithelial-mesenchymal transition-related gene levels
in evaluating the efficacy of liver cancer immunotherapy*

HAN Xue¹, LI Shuai¹, XU Rong², MA Wenjing³, HUANG Guohong^{1△}

1. Department of Clinical Laboratory; 2. Department of Oncology, People's Hospital of Xinjiang Uygur Autonomous Region, Urumqi, Xinjiang 830001, China; 3. Department of Clinical Laboratory, Urumqi Hospital of Traditional Chinese Medicine, Urumqi, Xinjiang 830002, China

Abstract:**Objective** To analyze the application value of epithelial-mesenchymal transition (EMT)-related genes in evaluating the efficacy of immunotherapy for liver cancer. **Methods** A total of 113 patients with liver cancer who received immunotherapy in the People's Hospital of Xinjiang Uygur Autonomous Region from January 2020 to January 2021 were included in the study. According to the prognosis of the patients, they were divided into the good prognosis group (75 cases) and the poor prognosis group (32 cases). EMT-related genes (Snail, Twist, E-cadherin, N-cadherin) were detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Multivariate Cox regression analysis was used to analyze the influencing factors of poor efficacy of immunotherapy for liver cancer. The receiver operating characteristic (ROC) curve was used to evaluate the diagnostic value of EMT-related genes for the efficacy of immunotherapy. A nomogram model was established to predict the efficacy of immunotherapy in patients, and the nomogram model was internally validated. The predictive performance of the model was quantified by the consistency index (C-index). **Results** The levels of Snail, Twist and N-cadherin in the good prognosis group were lower than those in the poor prognosis group (all $P<0.05$), and the level of E-cadherin was higher than that in the poor prognosis group ($P=0.001$). Multivariate Cox regression analysis showed that the levels of Snail, Twist and N-cadherin were independent risk factors for poor efficacy of immunotherapy in patients, and the level of E-cadherin was an independent protective factor. The C-in-

* 基金项目:新疆维吾尔自治区自然科学基金项目(2019D01C117)。
作者简介:韩雪,女,主管技师,主要从事分子生物学相关研究。 △ 通信作者,E-mail:huanguohong0127@163.com。
网络首发 <http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1176.R.20231127.1719.014.html>(2023-11-29)

dex of nomogram model predicting the prognosis of immunotherapy was 0.923 (95%CI 0.876—0.943). The results of ROC curve showed that the combination of Snail, Twist, E-cadherin and N-cadherin had a better predictive value than each index alone in predicting the poor efficacy of immunotherapy (all $P<0.05$). **Conclusion** The levels of EMT-related genes can effectively predict the prognosis of patients with immunotherapy, which is helpful for early liver cancer patients to take effective intervention measures for treatment.

Key words: epithelial-mesenchymal transition; gene expression; liver cancer; immunotherapy

肝癌是世界范围内最常见的致命性恶性肿瘤,肝细胞癌约占所有肝癌 90%,具有高发病率和高死亡率的特点,中国是全球肝癌高负担国家之一,患者确诊时往往进展为癌症晚期,预后不良^[1-3]。手术切除仍是治疗早期肝细胞癌最有效的方法,但大多数患者在就诊时已为晚期,无法切除,此外,由于手术切除后复发和转移率较高,患者预后仍不理想,早期识别可有效预测肝癌的生物标志物对准确评估患者预后具有重要意义^[4-5]。上皮间质转化(EMT)常发生在肿瘤侵袭和转移的开始,是恶性肿瘤侵袭转移的早期征象,表现为上皮细胞失去上皮细胞特征,转变为具有侵袭能力的间充质表型,从而获得迁移行为^[6]。研究显示,EMT 可作为癌症干预的潜在靶点,并提供了初步抗肿瘤治疗方向^[7],但目前关于 EMT 相关基因评估预后的特征研究较少。基于此,本研究分析 EMT 相关基因水平在评估肝癌免疫治疗效果方面的应用价值,以便为临床早期干预提供理论支持。

1 资料与方法

1.1 一般资料 将 2020 年 1 月至 2021 年 1 月于新疆维吾尔自治区人民医院行免疫治疗的 113 例肝癌患者纳入研究,纳入标准:(1)经病理诊断符合原发性肝细胞癌患者;(2)行手术切除治疗者;(3)术后接受免疫治疗者;(4)年龄 18~75 岁者;(5)预期生存期≥1 年者;(6)临床资料完整者。排除标准:(1)合并心、脑、肾等器官严重功能障碍者;(2)合并其他部位恶性肿瘤者;(3)合并自身免疫、血液系统疾病者;(4)对治疗药物过敏或不耐受者;(5)合并严重精神-神经系统功能障碍,不能配合者。所有患者及家属均对本研究知情,并签署知情同意书,本研究通过新疆维吾尔自治区人民医院伦理委员会审核并批准(批号:K20191218294)。经过 1 年随访,共有 6 例患者失联,按脱落处理,最终纳入患者 107 例。

1.2 仪器与试剂 仪器:4℃离心机、移液枪、微量紫外分光光度仪、酶标仪(主波长 450 nm,参考波长 630 nm),37℃孵育箱等。试剂:Trizol,三氯甲烷,E-钙黏蛋白(E-cadherin)、N-钙黏蛋白(N-cadherin)免疫组化试剂等,全部试剂均购自北京全式金生物技术有限公司。

1.3 方法 采用电子病历系统收集患者年龄、性别等一般临床资料。于术中留取生长活跃且无出血、坏死的肿瘤组织,置于-70℃内冰箱内保存。采用 Trizol 一步法提取肝癌组织块中的总 RNA,根据逆转录

试剂盒说明合成 cDNA,取 2 μL 逆转录产物进行 PCR 扩增,对患者肝癌组织中 Snail 及 Twist 水平进行检测。留取部分肿瘤组织,采用 PBS 缓冲液清洗 2~3 遍后加入适量蛋白裂解液,充分研磨后提取组织中的蛋白质,采用酶联免疫吸附试剂盒测定 E-cadherin、N-cadherin 水平。所有患者术后均给予免疫治疗,并于患者出院后进行为期 1 年的随访,前 3 个月每个月于门诊随访,后每 3 个月于门诊随访,在随访终点记录患者是否出现肿瘤复发、转移及死亡等,并根据随访结果将患者分为预后良好组及预后不良组,比较两组患者一般临床资料及 EMT 相关基因水平,分析 EMT 相关基因水平在评估患者免疫治疗预后方面的诊断价值。

1.4 统计学处理 所有数据均采用 SPSS22.0 软件进行处理和分析。呈正态分布的计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,组间比较采用独立样本 t 检验;计数资料以例数和百分率表示,组间比较采用 χ^2 检验;对单因素分析有统计学意义的变量行多因素 Cox 回归分析;绘制受试者工作特征(ROC)曲线评估预测模型的预测能力。使用 R 软件“rms”包建立患者免疫治疗疗效的列线图预测模型,并对列线图模型进行内部验证,并用一致性指数(C-index)量化模型预测性能,绘制校正曲线。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组患者一般资料比较 随访结束,预后良好组 75 例,预后不良组 32 例。预后不良组患者肿瘤最大径大于预后良好组($t=2.183, P=0.031$),而两组患者年龄、性别等一般资料比较,差异无统计学意义(均 $P>0.05$),见表 1。

表 1 两组患者一般资料比较[$\bar{x}\pm s$ 或 $n(\%)$]				
指标	预后良好组 ($n=75$)	预后不良组 ($n=32$)	t/χ^2	P
年龄(岁)	63.81±5.27	63.95±5.36	0.125	0.901
性别				
男	62(82.67)	28(87.50)	0.392	0.531
女	13(17.33)	4(12.50)		
肿瘤最大径(cm)	3.18±0.84	3.57±0.86	2.183	0.031
吸烟史	23(30.67)	10(31.25)	0.004	0.952
饮酒史	11(14.67)	6(18.75)	0.280	0.597
体重指数(kg/m ²)	22.15±2.62	21.46±2.75	1.229	0.222

续表 1 两组患者一般资料比较[$\bar{x}\pm s$ 或 $n(\%)$]				
指标	预后良好组 ($n=75$)	预后不良组 ($n=32$)	t/χ^2	P
基础疾病				
糖尿病	16(21.33)	6(18.75)	0.092	0.762
高血压	8(10.67)	7(21.88)	2.338	0.126
高脂血症	4(5.33)	2(6.25)	0.036	0.850
TNM 分期				
I ~ II 期	61(81.33)	24(75.00)	0.551	0.458
III 期	14(18.67)	8(25.00)		
分化程度				
高分化	14(18.67)	5(15.63)	0.920	0.631
中分化	42(56.00)	16(50.00)		
低分化	19(25.33)	11(34.38)		

2.2 EMT 相关基因水平比较 预后良好组患者的

表 2 EMT 相关基因水平比较($\bar{x}\pm s$, pg/mL)

组别	n	Snail	Twist	E-cadherin	N-cadherin
预后良好组	75	165.92±19.18	135.47±15.26	4.97±0.83	5.92±0.76
预后不良组	32	175.29±23.21	144.75±18.34	4.38±0.81	6.38±0.79
t		2.170	2.708	3.390	2.833
P		0.032	0.008	0.001	0.006

表 3 影响患者预后危险因素的 Cox 回归分析

相关指标	β	SE	$Wald\ \chi^2$	P	HR	95% CI
肿瘤最大径	0.512	0.357	2.053	0.152	1.668	0.828~3.359
Snail	0.026	0.013	4.065	0.044	1.026	1.001~1.052
Twist	0.063	0.019	10.938	0.001	1.065	1.026~1.105
E-cadherin	-0.828	0.353	5.508	0.019	0.437	0.219~0.872
N-cadherin	1.087	0.398	7.448	0.006	2.964	1.358~6.468

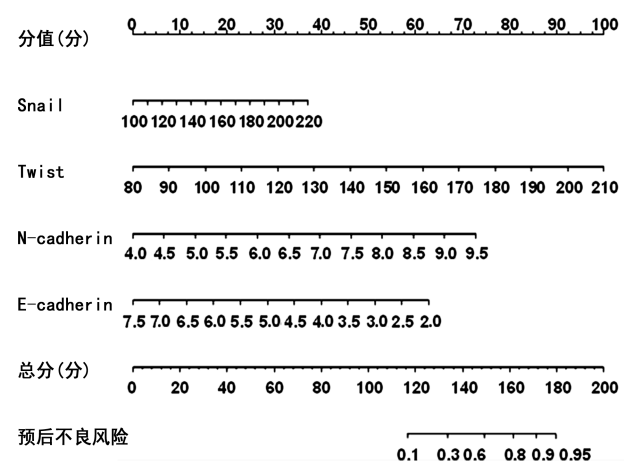


图 1 影响患者免疫治疗效果的相关因素列线图

Snail、Twist 及 N-cadherin 水平低于预后不良组(均 $P<0.05$), E-cadherin 水平高于预后不良组($P=0.001$),见表 2。

2.3 影响患者预后危险因素的 Cox 回归分析 将单因素分析有统计学意义的指标带入 Cox 回归方程进行分析,结果显示,Snail、Twist 及 N-cadherin 水平是患者免疫治疗效果不佳的独立危险因素, E-cadherin 水平则是独立保护因素(均 $P<0.05$),见表 3。

2.4 列线图模型及校正曲线 列线图模型显示,随着 Snail、Twist、N-cadherin 水平升高及 E-cadherin 水平降低列线图模型评分随之增加,随着列线图模型评分升高,患者免疫治疗预后不良风险升高,见图 1。列线图模型预测患者免疫治疗预后不良风险的 C-index 为 0.923(95%CI 0.876~0.943),区分度良好,经内部验证,获得校正曲线,结果显示列线图模型预测患者免疫治疗预后不良风险的绝对误差为 0.016,一致性良好,见图 2。

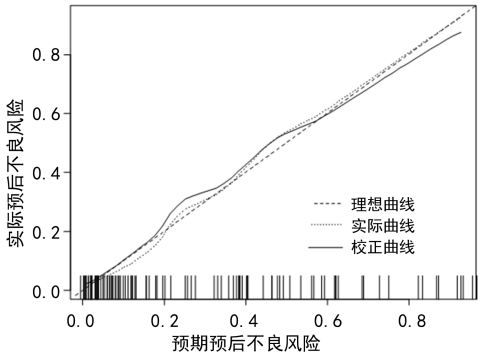


图 2 影响患者免疫治疗效果列线图的校正曲线

2.5 影响患者免疫治疗效果不佳因素的预测价值 ROC 曲线结果显示, Snail、Twist、E-cadherin、N-cadherin 及 4 项指标联合预测患者免疫治疗效果不佳的

曲线下面积 (AUC) 分别为 0.701、0.758、0.651、0.742 及 0.879, 4 项指标联合预测效能优于各项指标单独预测 ($Z=3.402, 2.522, 3.894, 2.987, P<0.05$)。见表 4。

表 4 影响患者免疫治疗效果不佳因素的预测价值

变量	AUC 95%CI	最佳临界值	灵敏度 (%)	特异度 (%)	约登指数
Snail	0.701(0.605~0.786)	178.91 pg/mL	50.000	86.670	0.367
Twist	0.758(0.666~0.836)	146.74 pg/mL	71.870	73.330	0.452
E-cadherin	0.651(0.553~0.741)	4.30 pg/mL	50.000	80.000	0.300
N-cadherin	0.742(0.648~0.822)	6.63 pg/mL	53.130	86.670	0.398
联合检测	0.879(0.802~0.934)	—	87.500	78.670	0.662

注:—为此项无数据。

3 讨 论

肝细胞癌是世界范围内恶性程度最高的癌症之一,因其具有高度异质性及高复发、高转移率,导致肝细胞癌患者生存期较短,尽管外科和药物治疗已取得快速进展,但肝细胞癌的死亡率仍居高不下^[8]。近年来免疫检查点抑制剂的引入极大地改变了包括肝细胞癌在内的肿瘤治疗方案^[9-10]。但低免疫应答率可严重影响免疫治疗疗效,故在免疫治疗前对患者免疫应答情况进行评估,对免疫治疗的选择及方案制订至关重要^[11]。随着高通量测序技术和生物信息学的快速发展,越来越多的基因生物标志物被发现是疾病诊断、治疗评估及预后的关键调控因子^[12-14]。

EMT 在癌细胞转移及耐药性中发挥关键作用,EMT 期间,细胞失去细胞-细胞和细胞-细胞外基质的黏附,获得间充质细胞表型,使得细胞从原发肿瘤分离^[15],也有研究证实了 EMT 与肿瘤进展和转移之间的联系^[16],EMT 参与胚胎发生和恶性肿瘤侵袭、转移,促进恶性肿瘤细胞侵袭并向远处组织扩散,从而促进肿瘤转移,既往研究证实 EMT 参与了肝细胞癌的进展^[17-18]。而癌细胞的转移导致 90% 以上的癌症相关死亡,在 EMT 过程中,上皮细胞失去极性并获得侵袭性,成为间充质干细胞^[19]。Snail 是著名的 EMT 激活转录因子,在肿瘤核组织、邻近间质和瘤周炎症中高度表达,可直接结合并抑制近端 CDH1 启动子上的 E-cadherin,并重塑细胞间黏附,还可抑制其他上皮标志物,并激活间充质基因。此外,EMT 还能重组上皮极性分子,阻碍基底膜形成,从而促进肿瘤细胞侵袭^[20]。本研究结果显示,对于免疫治疗预后不良的患者,其体内 Snail 水平升高,E-cadherin 水平降低,提示肝癌可能发生转移或进一步恶化,对免疫治疗应答不良,从而导致患者预后欠佳。

E-cadherin 主要表达于上皮细胞,E-cadherin 丢失是 EMT 程序中最基本事件,通过 Snail、Twist 等 EMT 诱导转录因子抑制 E-cadherin 等上皮样细胞标志物表达,同时上调 N-cadherin 等间质样细胞标志物表达,促进 EMT 进程,从而促进癌细胞转移^[21]。

Snail 在 EMT 中作为 E-cadherin 表达的关键转录抑制因子,赋予肿瘤细胞癌症干细胞样特征,并促进耐药、肿瘤复发和转移^[19,22]。既往动物实验显示,Snail 表达对小鼠乳腺癌细胞中 Zeb1 的诱导和转移播散至关重要,而 Twist 则是其他 EMT 转录因子表达所必需的,可诱导部分 EMT 和转移^[23]。本研究结果显示,Snail、Twist、N-cadherin 为患者免疫治疗预后的独立危险因素,E-cadherin 为独立保护因素,提示对于免疫治疗疗效不佳的患者,其肿瘤细胞可能发生 EMT 改变,而 EMT 相关基因高表达的患者,对免疫治疗不敏感,预后不良。这与 CHANG 等^[24]对结直肠癌患者的预后分析一致,CHANG 等^[24]研究表明,E-cadherin 低表达与结直肠癌患者的预后不良有关,可用于预测结直肠癌患者预后。此外,MASUDA 等^[25]对乳腺癌患者血液中的 N-cadherin 的 mRNA 水平进行分析,结果显示 N-cadherin 可作为预测乳腺癌患者转移、复发的新型预后生物标志物。尽管针对上述指标研究的肿瘤患者群体不尽相同,但对肿瘤的预测、分析结果却大同小异,提示 Snail、Twist、N-cadherin 及 E-cadherin 在预测肿瘤患者预后、治疗疗效方面具有一致性。

此外,本研究基于上述指标绘制 ROC 曲线,结果显示,Snail、Twist、N-cadherin 及 E-cadherin 联合预测患者免疫治疗效果不佳的预测效能优于各项指标单独预测,能对患者免疫治疗的疗效进行有效预测,对于免疫应答率低的患者应考虑给予其他干预以改善患者预后。列线图模型结果显示,根据 Snail、Twist、N-cadherin 及 E-cadherin 构建的预测模型具有较好的 C-index,并与实际发生的相关性较好,经内部验证的校正曲线也表明列线图模型可有效预测患者免疫治疗疗效,具有较好的临床应用价值。

综上所述,免疫治疗疗效不佳的患者其 Snail、Twist、N-cadherin 水平升高,而 E-cadherin 水平降低,4 项指标联合可有效预测患者对免疫治疗的敏感性。但本研究仍存在一定不足,受限于纳入样本量,导致分析因素较少,且并未对患者进行长期随访,亦

未对患者生存期及无进展生存期变化作进一步探究。故应进一步行多中心、大样本、前瞻性临床试验,以便对患者免疫应答情况进行预测,积极给予其他干预,以延长患者生存期,改善患者预后。

参考文献

[1] ANWANWAN D, SINGH S K, SINGH S, et al. Challenges in liver cancer and possible treatment approaches[J]. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer*, 2020, 1873(1):188314.

[2] SHI J F, CAO M, WANG Y, et al. Is it possible to halve the incidence of liver cancer in China by 2050[J]. *Int J Cancer*, 2021, 148(5):1051-1065.

[3] LI X, RAMADORI P, PFISTER D, et al. The immunological and metabolic landscape in primary and metastatic liver cancer[J]. *Nat Rev Cancer*, 2021, 21(9):541-557.

[4] CHEN S, ZHAO E. Development and validation of a robust epithelial-mesenchymal transition (EMT)-related prognostic signature for hepatocellular carcinoma[J]. *Clin Res Hepatol Gastroenterol*, 2021, 45(5):101587.

[5] ZHANG X, ZHU X J, ZHONG Z, et al. Small molecule-induced differentiation as a potential therapy for liver cancer[J]. *Adv Sci (Weinh)*, 2022, 9(15):e2103619.

[6] XU Z, ZHANG Y, DAI H, et al. Epithelial-mesenchymal transition-mediated tumor therapeutic resistance[J]. *Molecules*, 2022, 27(15):4750-4766.

[7] MORTEZAEE K, MAJIDPOOR J, KHARAZINEJAD E. Epithelial-mesenchymal transition in cancer stemness and heterogeneity; updated [J]. *Med Oncol*, 2022, 39(12):193-207.

[8] VOGEL A, MEYER T, SAPISOCHIN G, et al. Hepatocellular carcinoma[J]. *Lancet*, 2022, 400(10360):1345-1362.

[9] XIE Q, ZHANG P, WANG Y, et al. Overcoming resistance to immune checkpoint inhibitors in hepatocellular carcinoma; Challenges and opportunities[J]. *Front Oncol*, 2022, 12:958720.

[10] CHEN Y, HU H, YUAN X, et al. Advances in immune checkpoint inhibitors for advanced hepatocellular carcinoma[J]. *Front Immunol*, 2022, 13:896752.

[11] GAO B, WANG Y, LU S. Construction and validation of a novel signature based on epithelial-mesenchymal transition-related genes to predict prognosis and immunotherapy response in hepatocellular carcinoma by comprehensive analysis of the tumor microenvironment[J]. *Funct Integr Genomics*, 2022, 23(1):6-23

[12] OUYANG G, YI B, PAN G, et al. A robust twelve-gene signature for prognosis prediction of hepatocellular carcinoma

[J]. *Cancer Cell Int*, 2020, 20:207-224.

[13] ZHAO E, ZHOU C, CHEN S. Flap endonuclease 1 (FEN1) as a novel diagnostic and prognostic biomarker for gastric cancer[J]. *Clin Res Hepatol Gastroenterol*, 2021, 45(1):101455.

[14] ZHAO E, BAI X. Nomogram based on microRNA signature contributes to improve survival prediction of clear cell renal cell carcinoma[J]. *Biomed Res Int*, 2020, 2020:7434737.

[15] BABAEI G, AZIZ S G, JAGHI N. EMT, cancer stem cells and autophagy; The three main axes of metastasis[J]. *Biomed Pharmacother*, 2021, 133:110909.

[16] TAO C, HUANG K, SHI J, et al. Genomics and prognosis analysis of epithelial-mesenchymal transition in glioma[J]. *Front Oncol*, 2020, 21(10):183-195.

[17] ALQURASHI Y E, AL-HETTY H, RAMAIAH P, et al. Harnessing function of EMT in hepatocellular carcinoma: From biological view to nanotechnological standpoint[J]. *Environ Res*, 2023, 227:115683.

[18] DEBNATH P, HUIREM R S, DUTTA P, et al. Epithelial-mesenchymal transition and its transcription factors [J]. *Biosci Rep*, 2022, 42(1):BSR20211754.

[19] LIN X, CHAI G, WU Y, et al. RNA m6A methylation regulates the epithelial mesenchymal transition of cancer cells and translation of Snail[J]. *Nat Commun*, 2019, 10(1):2065-2078.

[20] CHO E S, KANG H E, KIM N H, et al. Therapeutic implications of cancer epithelial-mesenchymal transition (EMT)[J]. *Arch Pharm Res*, 2019, 42(1):14-24.

[21] RUBTSOVA S N, ZHITNYAK I Y, GLOUSGABJOVA N A. Dual role of E-cadherin in cancer cells[J]. *Tissue Barriers*, 2022, 10(4):2005420-2005441.

[22] HUANG Z, ZHANG Z, ZHOU C, et al. Epithelial-mesenchymal transition; the history, regulatory mechanism, and cancer therapeutic opportunities [J]. *MedComm (2020)*, 2022, 3(2):144-185.

[23] BRABLETZ S, SCHUHWERK H, BRABLETZ T, et al. Dynamic EMT; a multi-tool for tumor progression[J]. *EMBO J*, 2021, 40(18):e108647.

[24] CHANG K, JIANG L, SUN Y, et al. Effect of E-cadherin on prognosis of colorectal cancer; a meta-analysis update [J]. *Mol Diagn Ther*, 2022, 26(4):397-409.

[25] MASUDA T, UEO H, KAI Y, et al. N-Cadherin mRNA levels in peripheral blood could be a potential indicator of new metastases in breast cancer; a pilot study[J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(2):511.