

◇基础医学研究◇

# 油酸诱导的脂滴合成对骨肉瘤细胞增殖、迁移、侵袭和上皮-间质转化的影响

王梦婷<sup>1,2,3</sup>,王云龙<sup>1,2</sup>,梁梦霞<sup>1,2</sup>,刘俊<sup>2</sup>,卞尔保<sup>1,2</sup>

(<sup>1</sup>安徽医科大学药学科学学院,合肥 230022;<sup>2</sup>安徽医科大学第二附属医院骨科,合肥 230032;<sup>3</sup>安徽医科大学临床医学院,合肥 230012)

**摘要** 目的 探索不同浓度油酸作用于人骨肉瘤细胞株 143B 和 HOS 的效果,以及最佳浓度油酸对细胞脂滴合成、细胞功能的影响。**方法** 将 143B 和 HOS 细胞以 0、25、50、100、200  $\mu\text{mol/L}$  油酸处理 48 h,通过油红 O 和 BODIPY 染色确定最佳浓度,再用 CCK-8 和克隆形成实验检测其对细胞增殖的影响,用 Transwell 移迁实验检测对细胞迁移能力的影响;利用 Transwell 侵袭实验观察最佳浓度的油酸对细胞侵袭能力的影响;利用 Western blot 检测最佳浓度的油酸对细胞中上皮-间质转化(EMT)标志物上皮钙黏蛋白、神经钙黏蛋白表达的影响。**结果** 利用油酸处理 143B 和 HOS 后,细胞未见明显死亡现象,细胞内脂滴增加、骨肉瘤细胞增殖、迁移、侵袭和 EMT 能力增强。**结论** 油酸诱导骨肉瘤细胞脂滴合成,进而促进骨肉瘤细胞的增殖、迁移、侵袭和 EMT。

**关键词** 人骨肉瘤细胞株;脂滴合成;脂质代谢;油酸;增殖;迁移;侵袭

**中图分类号** R 966

**文献标志码** A **文章编号** 1000-1492(2026)01-0009-07

doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2026.01.003

骨肉瘤是一种来源于骨骼的原发恶性肿瘤,在儿童和青少年群体中的发病率最高<sup>[1]</sup>。局部侵袭和肺转移是骨肉瘤的主要特征,转移性骨肉瘤经常复发,预后不良<sup>[2]</sup>。尽管手术切除和多药化疗联合应用在一定程度上改善了骨肉瘤的预后,但是在过去的 20 年中,转移患者的生存率几乎没有明显改善<sup>[3]</sup>。局限性骨肉瘤患者 5 年生存率为 80%,而转移性骨肉瘤患者 5 年生存率不超过 30%<sup>[4]</sup>。近年来,肿瘤细胞脂质代谢异常成为研究热点,脂质代谢异常在肿瘤发生发展中扮演重要角色<sup>[5]</sup>。脂滴合成过度或不足会引发脂质代谢异常。油酸作为一种单不饱和脂肪酸,在细胞生理过程中具有多种功能,能够诱导细胞发生脂滴合成<sup>[6]</sup>。然而,目前关于油酸诱导细胞脂滴合成后,对骨肉瘤细胞的生长、迁移、侵袭和上皮-间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)等特性的作用,仍缺乏深入全面的认识。该研究通过体外实验探究油

酸诱导细胞脂滴合成对骨肉瘤细胞功能的影响,旨在揭示骨肉瘤发病机制,为开发新型治疗策略提供理论支撑,兼具重要科学意义与临床应用价值。

## 1 材料与方法

**1.1 材料** 人骨肉瘤细胞株 143B 和 HOS 购于中科院上海细胞所,细胞培养所需的 MEM 培养基、胎牛血清和双抗溶液购于美国 Gibco 公司;广州赛业生物科技有限公司提供油红 O 染色试剂盒;上海碧云天生物技术有限公司提供 Bradford 蛋白浓度测定试剂盒、基质胶及结晶紫染色液;Transwell 小室购于美国 Dickinson 公司;CCK-8 细胞检测试剂盒购于北京索莱宝科技有限公司;神经钙黏蛋白(货号:ab245117)、上皮钙黏蛋白(货号:ab40772)均购于英国的 Abcam 公司。

## 1.2 方法

**1.2.1 细胞培养与分组** 将人源骨肉瘤细胞系(143B 和 HOS)培养于添加了 10% 胎牛血清的 MEM 培养基中,置于 5% CO<sub>2</sub>、37 °C 的培养箱中培养。浓度筛选组:设 5 个亚组,分别用终浓度为 0(对照组)、25、50、100、200  $\mu\text{mol/L}$  的油酸处理细胞 48 h,筛选最佳油酸浓度。设对照组(0  $\mu\text{mol/L}$  油酸)

2025-10-25 接收

基金项目:国家自然科学基金项目(编号:81972348)

作者简介:王梦婷,女,硕士研究生;

卞尔保,男,博士,副研究员,硕士生导师,通信作者,E-

mail: bianerbao@ahmu.edu.cn

和最佳浓度处理组( $100 \mu\text{mol/L}$ 油酸),其中增殖检测(CCK-8法)培养48、72 h,克隆形成实验培养10~14 d,Transwell迁移与侵袭实验培养48 h,Western blot检测培养24 h。所有分组均设3个复孔,实验重复3次。

**1.2.2 油红O染色** 每组细胞均以PBS冲洗3次,随后采用4%多聚甲醛溶液固定细胞1 h,60%异丙醇进行洗涤,静置5 min,使用预先配置好的油红O工作液,避光室温下孵育30 min;弃去油红O工作液,用PBS再次清洗样本,在显微镜(日本OLYMPUS)下进行观察及拍摄记录。

**1.2.3 BODIPY脂质染色** 使用4%多聚甲醛溶液固定细胞15 min,固定完成后,用PBS清洗细胞3次。接着在避光条件下,让细胞与BODIPY染料共同孵育20 min,再用PBS清洗3次。最后,将DAPI染料添加到6孔板中,在避光条件下孵育5 min。接着用PBS清洗3次,最后将样品放到激光共聚焦显微镜下观察并拍摄图像。

**1.2.4 CCK-8法检测细胞活力** 在CCK-8实验中,将接种于96孔板中的细胞与CCK-8溶液在37 °C条件下孵育3 h。使用酶标仪在450 nm波长处测量吸光度(absorbance,A)。

**1.2.5 克隆形成实验** 用血细胞计数板或细胞计数仪计数细胞,调整细胞浓度至1 000个/mL左右。将细胞悬液按 $100 \mu\text{L}/\text{孔}$ 的量接种到6孔板中,每孔加入100个细胞左右。轻轻晃动培养板,使细胞均匀分布,经过14 d的培养,肉眼可见细胞集落形成时,终止孵育;随后使用4%的多聚甲醛对待测细胞进行15 min的固定,使用结晶紫染液处理细胞10 min后,使用PBS冲洗3次,最后将染色细胞进行计数,并进行记录统计。

**1.2.6 Transwell侵袭和迁移实验** 迁移和侵袭实验采用Transwell小室进行,无基质胶的小室用于迁移实验,而有基质胶的小室用于侵袭实验。将细胞置于0.2 mL无血清的MEM培养基中,用于侵袭实验。在下室中加入含有趋化因子的完全培养基。48 h后,用棉签擦去上室小室膜上表面的细胞。随后,将下室小室膜固定20 min,再用0.2%的结晶紫染色。迁移实验中不用基质胶,其他过程同侵袭实验。

**1.2.7 蛋白免疫印迹** 将143B和HOS细胞分别接种至6孔板中,其中一组在处理过程中添加了 $100 \mu\text{mol/L}$ 油酸,持续处理24 h,另一组则不进行处

理。随后,使用含有磷酸酶和蛋白酶抑制剂的RIPA裂解缓冲液裂解细胞,并通过Bradford蛋白定量试剂盒测定蛋白浓度。将蛋白样品在10% SDS-PAGE凝胶中进行分离,并转移至PVDF膜上。为阻断非特异性结合,所有膜在Beyotime公司提供的快速封闭缓冲液中封闭10 min,然后与针对E-钙黏蛋白和N-钙黏蛋白的一抗在4°C下孵育过夜。第二天,将膜与相应的二抗在室温下孵育1 h,然后使用增强型化学发光底物使蛋白条带显影,并用FlourChem HD2成像系统拍摄蛋白条带的图像。

**1.3 统计学处理** 所有实验均重复进行3次,每个独立实验均设置3次重复以计算平均值。使用GraphPad Prism 8.0软件进行统计分析。数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用t检验。多组间比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 被认为具有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 细胞脂滴合成情况** 不同浓度的油酸处理细胞48 h后,通过油红O染色方法来观察细胞形态及脂滴沉积的变化。未经油酸处理的143B和HOS细胞呈现出正常的形态,仅少数组细胞呈现出轻微的红色脂滴聚集区;而在油酸的作用下,这些细胞中的红色脂滴聚集现象显著增加。在 $100 \mu\text{mol/L}$ 油酸条件下,细胞状态最佳,细胞质内形成明显的环状红色脂滴聚集区;但随着油酸浓度进一步升高,细胞形态发生了显著变化,当浓度超过 $200 \mu\text{mol/L}$ 时,观察到了明显的细胞破裂与死亡。因此,将 $100 \mu\text{mol/L}$ 作为最佳浓度,在此条件下处理48 h后,143B和HOS细胞能够形成清晰可见的脂滴沉积,且未伴随大量细胞死亡(图1)。BODIPY染色结果也验证了随着油酸浓度的增加,脂滴聚集的区域在143B和HOS细胞中逐渐扩大。在 $100 \mu\text{mol/L}$ 浓度下,细胞质内出现了明显的脂滴积累(图2)。以上结果表明,油酸能够有效促进骨肉瘤细胞脂滴的形成。

**2.2 CCK-8实验和克隆形成实验检测油酸处理组对骨肉瘤细胞增殖能力的影响** CCK-8检测结果显示,相比对照组,油酸( $100 \mu\text{mol/L}$ )处理48、72 h组的143B和HOS细胞存活能力均明显增强,见图3A。克隆形成实验检测结果显示,相比对照组,油酸( $100 \mu\text{mol/L}$ )处理组143B和HOS细胞克隆数量明显增强,见图3B、3C。上述结果表明油酸( $100 \mu\text{mol/L}$ )促进骨肉瘤细胞增殖。

**2.3 Transwell检测油酸处理对细胞迁移、侵袭能**

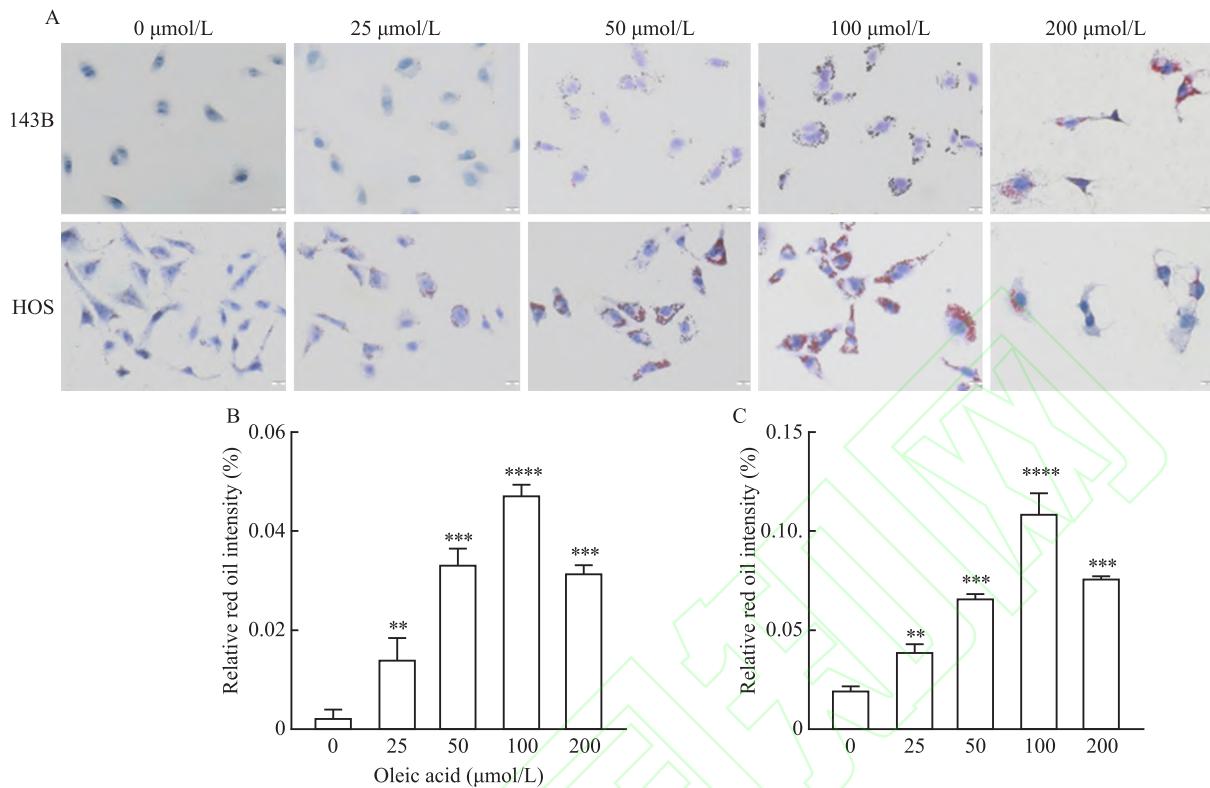


图 1 油红 O 染色检测不同浓度油酸处理 143B 和 HOS 细胞脂滴合成的影响

Fig. 1 The effects of oleic acid at different concentrations on lipid droplet synthesis in 143B and HOS cells detected by Oil Red O staining

A: Oil Red O staining images of 143B and HOS cells treated with different concentrations of oleic acid  $\times 200$ ; B, C: Statistical histogram of Oil Red O staining of 143B and HOS cells treated with different concentrations of oleic acid; \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ , \*\*\*\* $P < 0.0001$  vs 0  $\mu\text{mol/L}$  group.

力的影响 Transwell 迁移实验检测结果显示,与对照组比,油酸处理组(100  $\mu\text{mol/L}$ )的 143B 和 HOS 细胞迁移能力增强,见图 4A。Transwell 侵袭实验检测结果显示,与对照组比,油酸处理组(100  $\mu\text{mol/L}$ )的 143B 和 HOS 细胞侵袭能力增强,见图 4B。

**2.4 Western blot 检测油酸处理对细胞 EMT 的影响** Western blot 法检测 EMT 标志物 E-cadherin、N-cadherin,结果显示,与对照组相比,油酸(100  $\mu\text{mol/L}$ )处理组 E-cadherin 减少,N-cadherin 增加。表明 100  $\mu\text{mol/L}$  油酸促进 143B 和 HOS 细胞的 EMT。见图 5。

### 3 讨论

本研究探讨了油酸体外诱导细胞脂滴合成对骨肉瘤细胞功能的影响,为理解骨肉瘤的发病机制提供了新视角。脂滴的合成是一个复杂的过程,涉及多种酶的参与。其中,二酰甘油酰基转移酶(DGAT)在脂滴合成中起着核心作用<sup>[7]</sup>。脂肪酸-CoA 与二酰甘油(DAG)被 DGAT 催化,从而生成三酰甘油(TAG),油酸在 DGAT 作用下大量参与 TAG

合成,促使脂滴形成与增大<sup>[8]</sup>。此外,磷脂酸磷酸酶(PAP)等酶也通过调节脂质代谢的中间产物,间接影响脂滴的合成。PAP 能够将磷脂酸转化为 DAG,为 DGAT 提供底物,进而促进脂滴合成<sup>[9]</sup>。已有研究<sup>[10]</sup>表明脂滴作为一种细胞器贮存与释放多余脂质,促进肿瘤发生。本研究结果显示,经过 48 h 不同浓度油酸处理后,143B 和 HOS 细胞在 100  $\mu\text{mol/L}$  油酸处理组中,细胞形态发生了显著改变,表现为细胞变圆,并伴有明显的脂质沉积现象。同时,细胞死亡率未见显著升高。这些结果表明,100  $\mu\text{mol/L}$  油酸能够有效诱导骨肉瘤细胞脂滴的合成。

在细胞增殖方面,油酸经  $\beta$ -氧化产生大量 ATP,为细胞的 DNA 复制、蛋白质合成以及有丝分裂等过程提供充足能量<sup>[11]</sup>。同时,脂肪酸也是磷脂和胆固醇等生物膜成分合成的重要原料,为骨肉瘤细胞增殖过程中细胞膜的扩张和细胞器的增多提供物质基础<sup>[12]</sup>。这些综合作用改变了细胞内脂质代谢的平衡,使脂质更多以脂滴的形式储存起来,为骨肉瘤细胞的生长和增殖提供了丰富的能量储备。本研究结果显示,油酸处理组增殖能力增强。

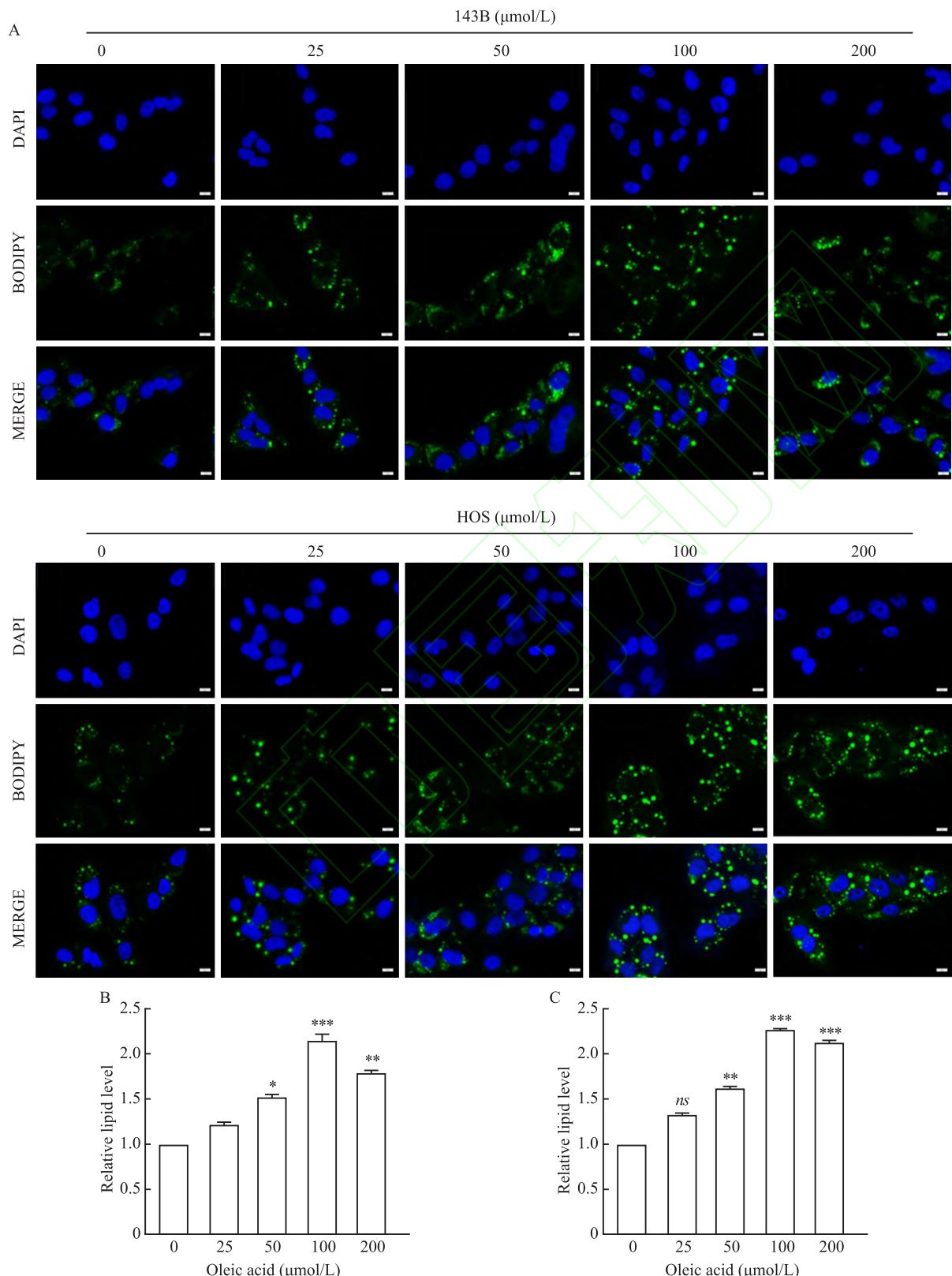


图2 BODIPY 检测不同浓度油酸处理对 143B 和 HOS 细胞脂滴合成的影响

**Fig. 2 The effects of oleic acid at different concentrations on lipid droplet synthesis in 143B and HOS cells detected by BODIPY staining**

**A:** BODIPY staining images (oil immersion lens  $\times 200$ ) of 143B and HOS cells treated with different concentrations of oleic acid; **B, C:** Statistical histogram of BODIPY staining of 143B and HOS cells treated with different concentrations of oleic acid;  $*P < 0.05$ ,  $**P < 0.01$ ,  $***P < 0.001$  vs  $0 \mu\text{mol/L}$  group.

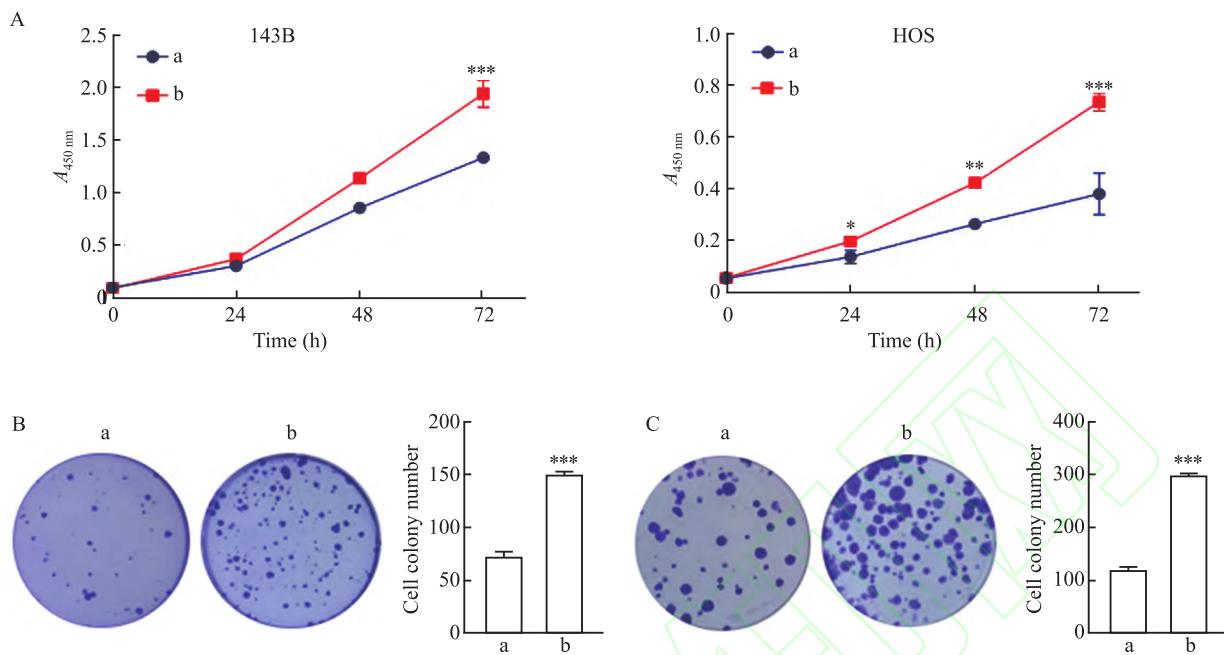


图 3 油酸对骨肉瘤细胞增殖的影响

Fig. 3 The effects of oleic acid on the proliferation of osteosarcoma cells

A: The CCK-8 assay was used to detect the proliferation ability of 143B and HOS cells in the presence or absence of oleic acid treatment; B,C: The colony formation assay was performed to evaluate the colony-forming ability of 143B and HOS cells with or without oleic acid treatment, along with the statistical histogram of the colony formation assay counting of 143B and HOS cells; a:Control group;b:Oleic acid-treated group; \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ , \*\*\* $P<0.001$  vs Control group.

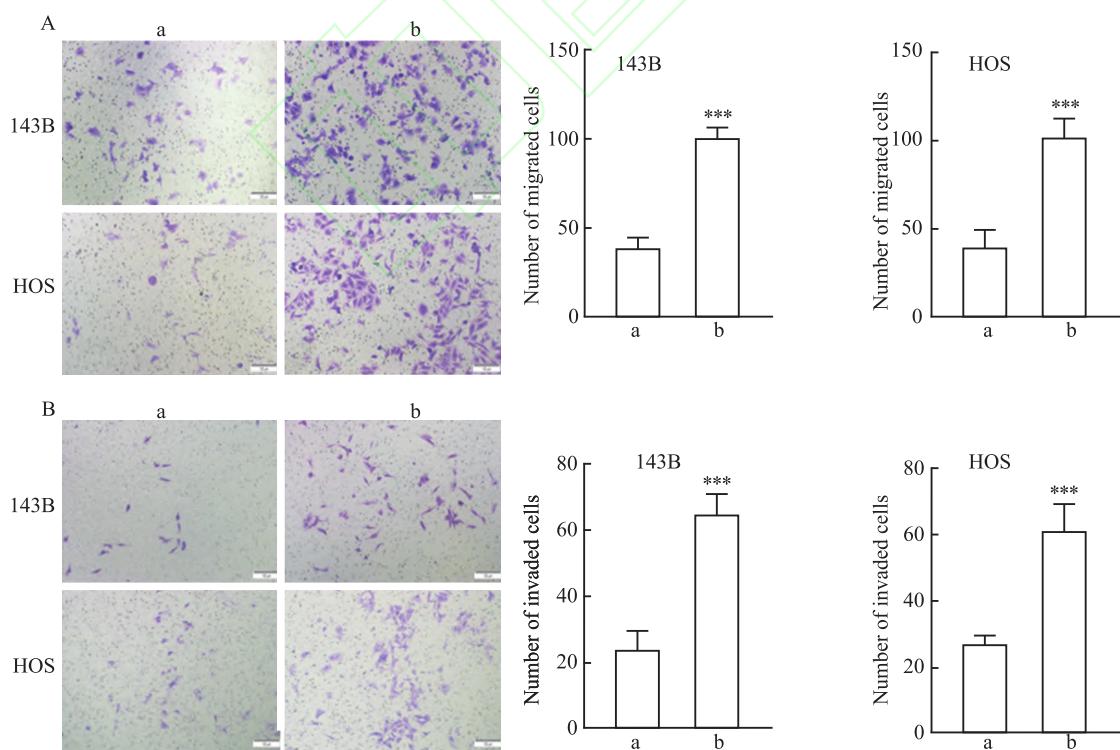


图 4 油酸对骨肉瘤细胞迁移、侵袭能力的影响

Fig. 4 The effects of oleic acid on the migration and invasion abilities of osteosarcoma cells

A, B: Transwell assay was performed to detect the migratory and invasive ability of 143B and HOS cells (oil immersion lens  $\times 100$ ) ; a: Control group;b:Oleic acid-treated group; \*\*\* $P<0.001$  vs Control group.

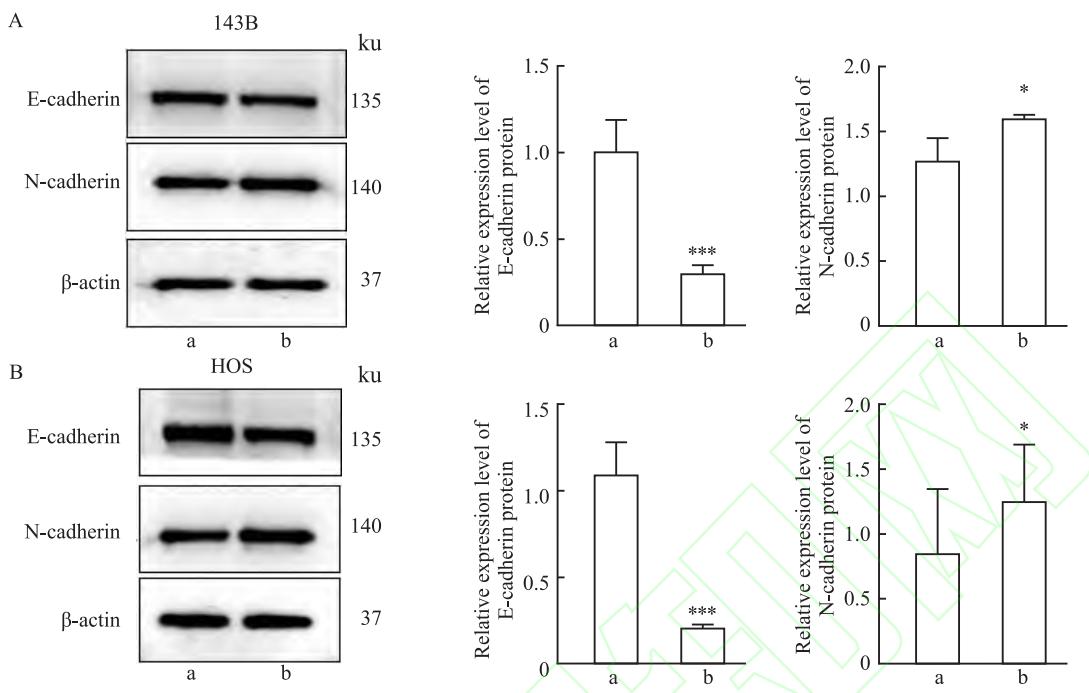


图 5 油酸对骨肉瘤细胞 EMT 的影响

Fig. 5 The effects of oleic acid on EMT in osteosarcoma cells

A, B: Expression of EMT markers in 143B and HOS cells detected by Western blot assay; a: Control group; b: Oleic acid-treated group;  $*P < 0.05$ ,  $***P < 0.001$  vs Control group.

进一步证明了油酸具有促进骨肉瘤恶性行为的作用。

在细胞迁移和侵袭能力方面,油酸诱导的脂滴合成也起到了促进作用。细胞迁移和侵袭的重要基础是细胞骨架的重塑,而油酸处理后的骨肉瘤细胞内肌动蛋白细胞骨架发生了显著变化,使得细胞具有更强的运动能力<sup>[13]</sup>。骨肉瘤预后较差主要在于肿瘤转移,EMT 对癌细胞迁移、侵袭意义重大。N-cadherin 蛋白表达增多,利于 EMT 与转移;E-cadherin 蛋白水平降低,破坏细胞连接,抑制 EMT 与转移<sup>[14]</sup>。已有文献<sup>[15]</sup>指出,这两种钙黏蛋白与恶性肿瘤的发展及其转移行为密切相关。本研究结果显示,油酸处理组 E-cadherin 蛋白水平显著减少,N-cadherin 蛋白水平有所上升,表明油酸在调节骨肉瘤 EMT 过程中的关键作用。此外,肿瘤细胞在能量应激状态下,会动员脂滴中的脂质,通过线粒体脂肪酸氧化磷酸化产生能量<sup>[16]</sup>。油酸可能通过影响脂滴与线粒体的相互作用,进而调节肿瘤细胞的能量代谢和运动能力。未来可进一步探讨油酸及脂滴在肿瘤细胞运动中的具体作用机制。

## 参考文献

[1] Difilippo V, Saba K H, Styring E, et al. Osteosarcomas with few

chromosomal alterations or adult onset are genetically heterogeneous [J]. Lab Invest, 2024, 104 (1) : 100283. doi: 10.1016/j.labinv.2023.100283.

- [2] Odri G A, Tchicaya-Bouanga J, Yoon D J Y, et al. Metastatic progression of osteosarcomas: a review of current knowledge of environmental versus oncogenic drivers [J]. Cancers, 2022, 14 (2) : 360. doi:10.3390/cancers14020360.
- [3] Wang J, Zhang Y, Li Z. Advancements in understanding the role of circular RNA in osteosarcoma [J]. Mol Biotechnol, 2024, 66 (9) : 2157-67. doi:10.1007/s12033-023-00838-4.
- [4] Patel T D, Grimm S L, Kanchi R S, et al. Identification of an early survival prognostic gene signature for localized osteosarcoma patients [J]. Sci Rep, 2024, 14 (1) : 7327. doi: 10.1038/s41598-024-57527-8.
- [5] Pang M, Yu L, Li X, et al. A promising anti-tumor targeting on ERMMDS mediated abnormal lipid metabolism in tumor cells [J]. Cell Death Dis, 2024, 15 (8) : 562. doi: 10.1038/s41419-024-06956-4.
- [6] Ali H, Yamanishi M, Sunagawa K, et al. Protective effect of oleic acid against very long-chain fatty acid-induced apoptosis in peroxisome-deficient CHO cells [J]. Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids, 2024, 1869 (3) : 159452. doi: 10.1016/j.bbalip.2024.159452.
- [7] Jia Y L, Zhang Q M, Du F, et al. Identification of lipid synthesis genes in *Schizophyllum* sp. and their application in improving eicosapentaenoic acid synthesis in *Yarrowia lipolytica* [J]. Biotechnol Biofuels Bioprod, 2024, 17 (1) : 32. doi: 10.1186/s13068-024-02471-y.
- [8] Liu K, Li J, Xing C, et al. Characterization of *Auxenochlorella protothecoides* acyltransferases and potential of their protein

- interactions to promote the enrichment of oleic acid [J]. *Biotechnol Biofuels Bioprod*, 2023, 16(1): 69. doi: 10.1186/s13068-023-02318-y.
- [9] Stukey G J, Breuer M R, Burchat N, et al. The antidepressant drug sertraline is a novel inhibitor of yeast Pah1 and human lipin 1 phosphatidic acid phosphatases [J]. *J Lipid Res*, 2025, 66(1): 100711. doi: 10.1016/j.jlr.2024.100711.
- [10] Cui Y, Man S, Tao J, et al. The lipid droplet in cancer: from being a tumor-supporting hallmark to clinical therapy [J]. *Acta Physiol*, 2024, 240(3): e14087. doi: 10.1111/apha.14087.
- [11] Bi J, Li Y, Yang Z, et al. Analysis of the effect of steaming times on lipid composition of pork belly based on lipidomics technology [J]. *J Food Compos Anal*, 2023, 117: 105143. doi: 10.1016/j.jfca.2023.105143.
- [12] Dubois-Brissonnet F. Characterization of bacterial membrane fatty acid profiles for biofilm cells [J]. *Methods Mol Biol*, 2025, 2852: 135-41. doi: 10.1007/978-1-0716-4100-2\_9.
- [13] Masner M, Lujea N, Bisbal M, et al. Linoleic and oleic acids enhance cell migration by altering the dynamics of microtubules and the remodeling of the actin cytoskeleton at the leading edge [J]. *Sci Rep*, 2021, 11(1): 14984. doi: 10.1038/s41598-021-94399-8.
- [14] 杜明珠, 张斌. 敲低E2F1抑制人舌鳞癌细胞增殖及迁移的机制研究[J]. 安徽医科大学学报, 2024, 59(12): 2127-34. doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2024.12.009.
- [14] Du M Z, Zhang B. The mechanism of knockdown of E2F1 inhibiting the proliferation and migration of human tongue squamous cell carcinoma cells[J]. *Acta Univ Med Anhui*, 2024, 59(12): 2127-34. doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2024.12.009.
- [15] 詹晓璇, 刘城移, 彭佳华, 等. 桂皮醛调控RPS7表达抑制人子宫内膜异位症细胞生长、转移及诱导凋亡[J]. 安徽医科大学学报, 2025, 60(3): 405-13. doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2025.03.004.
- [15] Zhan X X, Liu C Y, Peng J H, et al. Cinnamaldehyde inhibits growth, metastasis and induces apoptosis of human endometriotic cells through RPS7[J]. *Acta Univ Med Anhui*, 2025, 60(3): 405-13. doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2025.03.004.
- [16] Liu R, Lee J H, Li J, et al. Choline kinase alpha 2 acts as a protein kinase to promote lipolysis of lipid droplets[J]. *Mol Cell*, 2021, 81(13): 2722-35. e9. doi: 10.1016/j.molcel.2021.05.005.

## Effects of oleic acid-induced lipid droplet synthesis on the proliferation, migration, invasion, and epithelial-mesenchymal transition of osteosarcoma cells

Wang Mengting<sup>1,2,3</sup>, Wang Yunlong<sup>1,2</sup>, Liang Mengxia<sup>1,2</sup>, Liu Jun<sup>2</sup>, Bian Erbao<sup>1,2</sup>

(<sup>1</sup> School of Pharmacy, Anhui Medical University, Hefei 230022; <sup>2</sup> Department of Orthopedics, Second Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230032;

<sup>3</sup> School of Clinical Medicine, Anhui Medical University, Hefei 230012)

**Abstract Objective** To explore the effects of different concentrations of oleic acid on human osteosarcoma cell lines 143B and HOS, as well as the impacts of the optimal concentration of oleic acid on cellular lipid droplet synthesis and cell functions. **Methods** The 143B and HOS cells were treated with varying concentrations of oleic acid (0, 25, 50, 100, and 200 μmol/L) for 48 hours. Following treatment, Oil Red O staining and BODIPY staining were performed to determine the optimal concentration. Subsequently, CCK-8 assays and colony formation experiments were conducted to assess the effect of this optimal concentration of oleic acid on the cell proliferation of both cell lines. Transwell migration assays were utilized to evaluate the influence of the optimal concentration on migratory capacity and Transwell invasion assays were utilized to evaluate the invasive ability. Additionally, Western blot analysis was employed to examine the expression levels of epithelial-mesenchymal transition (EMT) markers Epithelial Cadherin (E-cadherin) and Neural Cadherin (N-cadherin) in response to treatment with the optimal concentration of oleic acid. **Results** Treatment with oleic acid did not induce significant cell death in either 143B or HOS cells; however, an increase in intracellular lipid droplets was observed alongside enhanced proliferation, migration, invasion capabilities as well as EMT transformation potential. **Conclusion** Oleic acid induces lipid droplet synthesis in osteosarcoma cells which subsequently promotes their proliferation, migration and invasion abilities along with EMT transformation.

**Key words** human osteosarcoma cell line; lipid droplet synthesis; lipid metabolism; oleic acid; proliferation; migration; invasion

**Fund program** National Natural Science Foundation of China (No. 81972348)

**Corresponding author** Bian Erbao, E-mail: bianerbao@ahmu.edu.cn