

doi: 10.7499/j.issn.1008-8830.2212057

论著·临床研究

室间隔缺损与 *HAND2* 基因罕见变异的关联分析

李美琨¹ 逢淑超^{2,3} 闫波^{1,4}

(1. 山东大学齐鲁医学院, 山东济南 250012; 2. 山东省中美转化医学合作研究中心, 山东济宁 272029; 3. 济宁医学院附属医院心血管疾病分子遗传学中心, 山东济宁 272029; 4. 济宁医学院精准医学研究院, 山东济宁 272029)

[摘要] **目的** 对室间隔缺损 (ventricular septal defect, VSD) 与 *HAND2* 基因启动子区罕见变异的关联性进行分析, 并对相关分子机制进行初步探索。**方法** 收集 349 例 VSD 组患儿和 345 例健康对照组儿童血液样本, 通过聚合酶链反应扩增目的片段并进行测序, 确定 *HAND2* 基因启动子区的罕见变异位点。使用双荧光素酶检测进行变异位点功能分析, 并通过电泳迁移率变动分析进行分子机制研究, 同时使用 TRANSFAC 和 JASPAR 数据库预测转录因子。**结果** 通过测序发现 3 个变异位点 (g.173530852A>G、g.173531173A>G 和 g.173531213C>G) 只出现在 10 例 VSD 患儿的 *HAND2* 基因启动子上, 其中 4 例患儿仅有 1 个变异位点。双荧光素酶检测显示 g.173531213C>G 降低了 *HAND2* 基因启动子转录活性。电泳迁移率变动分析和转录因子预测提示 g.173531213C>G 产生了 1 个转录因子结合位点。**结论** *HAND2* 基因启动子区的罕见变异 g.173531213C>G 可能通过影响转录因子的结合, 进而参与 VSD 的发生发展。 [中国当代儿科杂志, 2023, 25 (4): 388-393]

[关键词] 室间隔缺损; *HAND2* 基因; 罕见变异; 儿童

Association of ventricular septal defect with rare variations of the *HAND2* gene

LI Mei-Kun, PANG Shu-Chao, YAN Bo. Cheeloo College of Medicine, Shandong University, Jinan 250012, China/Institute of Precision Medicine, Jining Medical University, Jining, Shandong 272029, China (Yan B, Email: yanbo@mail.jnmc.edu.cn)

Abstract: Objective To study the association of ventricular septal defect (VSD) with rare variations in the promoter region of *HAND2* gene, as well as related molecular mechanisms. **Methods** Blood samples were collected from 349 children with VSD and 345 healthy controls. The target fragments were amplified by polymerase chain reaction and sequenced to identify the rare variation sites in the promoter region of the *HAND2* gene. Dual-luciferase reporter assay was used to perform a functional analysis of the variation sites. Electrophoretic mobility shift assay (EMSA) was used to investigate related molecular mechanisms. TRANSFAC and JASPAR databases were used to predict transcription factors. **Results** Sequencing revealed that three variation sites (g. 173530852A>G, g. 173531173A>G, and g. 173531213C>G) were only observed in the promoter region of the *HAND2* gene in 10 children with VSD, among whom 4 children had only one variation site. The dual-luciferase reporter assay revealed that g.173531213C>G reduced the transcriptional activity of the *HAND2* gene promoter. EMSA and transcription factor prediction revealed that g.173531213C>G created a binding site for transcription factor. **Conclusions** The rare variation, g.173531213C>G, in the promoter region of the *HAND2* gene participates in the development and progression of VSD possibly by affecting the binding of transcription factors. [Chinese Journal of Contemporary Pediatrics, 2023, 25(4): 388-393]

Key words: Ventricular septal defect; *HAND2* gene; Rare variation; Child

[收稿日期] 2022-12-14; [接受日期] 2023-02-27

[基金项目] 国家自然科学基金项目 (81870279)。

[作者简介] 李美琨, 男, 硕士研究生。

[通信作者] 闫波, 男, 教授。Email: yanbo@mail.jnmc.edu.cn。

室间隔缺损 (ventricular septal defect, VSD) 是导致新生儿因出生缺陷死亡的主要原因之一^[1-4]。心脏发育阶段各种调控因子失调, 进而导致心脏发育缺陷, 是VSD发生发展的主要原因^[5]。作为哺乳动物最先形成的器官, 心脏的发育受到各种信号通路和转录调控网络的影响^[6-9]。*HAND* 转录因子家族属于碱性螺旋-环-螺旋家族成员, 包含 *HAND1* 和 *HAND2* 两个基因亚型。*HAND1* 基因和 *HAND2* 基因最早表达于神经嵴和中胚层。随着心脏发育, *HAND1* 基因特异性地表达于第一生心区、左心室和左、右心房中, 而 *HAND2* 基因则特异性表达于第二生心区、右心室和流出道^[4, 10-12]。研究表明, *HAND2* 基因的表达水平在右心室肥厚患者中明显增高^[13]。同时发现, 在心脏发育阶段, *HAND2* 基因的表达缺失可以加快心脏前体细胞凋亡, 进而导致右心室严重发育不全^[14]。更多的研究也证明, *HAND2* 基因在心脏发育阶段的表达缺失与VSD的发生发展具有显著的相关性^[15-17]。

罕见变异一般指最小等位基因频率小于0.05的遗传变异, 尽管其出现的频率很低, 但越来越多的研究发现罕见变异对于复杂性疾病的发生发展起到关键的作用^[18-20]。启动子作为基因重要的顺式作用元件, 对于基因的转录起关键的调控作用。

综上所述, 我们认为心脏发育阶段 *HAND2* 基因的表达缺失是VSD发生发展的关键因素。同时, 我们推测 *HAND2* 基因启动子区的罕见变异是导致 *HAND2* 基因启动子转录活性降低, 进而造成 *HAND2* 基因表达缺失的因素之一。因此, 我们通过病例对照研究, 寻找出能够影响 *HAND2* 基因启动子转录活性的罕见变异位点, 并尝试探索其分子机制。

1 资料与方法

1.1 研究方法

回顾性收集2018年12月—2021年2月在济宁医学院附属医院就诊并确诊为VSD的患儿共349例 [男性204例, 女性145例, 中位年龄为6 (3, 8) 岁] 作为VSD组。健康对照组儿童共345例 [男性168例, 女性177例, 中位年龄为5 (3, 8) 岁], 均来自同期在济宁医学院附属医院儿童体检中心的健康体检儿童。VSD的诊断标准是超声心动图显示室间隔部位有异常血流穿过, 报告结果为VSD。排除标准是患有家族性先天性心脏病或其他

缺陷性疾病的VSD患儿。本研究已获济宁医学院医学伦理委员会批准 (2017-FY-079), 并严格遵循《赫尔辛基宣言》原则。所有研究对象的监护人均对本研究知情同意, 并签署书面知情同意书。

1.2 启动子片段测序

抽取研究对象的外周静脉血, 使用细胞分离液分离出单个核细胞。通过DNA提取试剂盒提取出单个核细胞中的基因组DNA。选择研究的目的片段为 *HAND2* 基因序列 -1 300 bp 至 +46 bp (1 346 bp, chr4: 173530184-173531529, NC_000004.12)。使用NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 中BLAST程序设计引物 [正向: 5'-(Kpn III I) -GTTGACACCGTTTTCCACACC-3'; 反向: 5'-(Hind III) -TGAGGGGAGCAAGCGGATTT-3']。引物由上海生工生物工程股份有限公司合成。已提取的基因组DNA作为模板, 使用上述引物通过聚合酶链反应扩增, 并将产物送往上海生工生物工程股份有限公司进行测序。使用DNAMAN和Chromas软件核对并统计测序结果。

1.3 双荧光素酶检测

将目的片段重组到pGL3-Basic表达载体上, 并将重组质粒转染到H9C2细胞中, 使用双荧光素酶报告基因检测试剂盒及发光仪检测荧光素酶活性。*HAND2* 基因启动子的转录活性由萤火虫荧光素酶 (由pGL3-Basic表达) 活性和海肾荧光素酶 (由pRL-TK表达) 活性的比值表示。将野生型 *HAND2* 基因启动子的转录活性设为100%。阴性对照为空的pGL3-Basic, 内参为pRL-TK。

1.4 电泳迁移率变动分析

提取H9C2细胞的核提取物 (使用Thermo Scientific的NEPER™核和胞质提取试剂盒)。取变异位点上下游共30 bp的序列作为探针, 并由上海生工生物工程股份有限公司合成。使用Thermo Fisher Scientific的LightShift®化学发光电泳迁移率变动分析 (electrophoretic mobility shift assay, EMSA) 试剂盒进行EMSA实验。

1.5 统计学分析

采用R语言进行数据处理。符合正态分布的计量资料用均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 两组间比较使用两样本 *t* 检验; 不符合正态分布的计量资料用中位数 (四分位数间距) [$M (P_{25}, P_{75})$] 表示, 两组间比较使用Wilcoxon秩和检验。计数资料用例数和百分率 (%) 表示, 组间比较采用Fisher确切概率法。使用TRANSFAC (<http://gene-regulation>).

com) 和 JASPAR (<https://jaspar.genereg.net/>) 转录因子数据库对转录因子进行预测。转染实验和 EMSA 独立重复 3 次以上。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 *HAND2* 基因启动子区的测序结果

通过测序, 发现有 3 个变异位点 (g.173530852 A>G、g.173531173A>G 和 g.173531213C>G) (图 1) 只出现在 10 例 VSD 患儿中, 其中 4 例患儿仅有 1 个变异位点, 同时这 4 例患儿均为室间隔膜周部缺损, 见表 1。VSD 组和健康对照组 g.173531213C>G 分布情况比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 见表 2。

2.2 罕见变异对 *HAND2* 基因启动子转录活性的影响

使用双荧光素酶检测, 分析上述罕见变异对 *HAND2* 基因启动子转录活性的影响。将重组 pGL3-Basic 质粒 (pGL3-WT、pGL3-173530852G、pGL3-173531173G、pGL3-173531213G) 与 pRL-TK 共转染至 H9C2 细胞中, 结果显示, g.173531213C>G 降低了 *HAND2* 基因启动子转录活性 ($P < 0.05$), 而 g.173530852A>G 和 g.173531173A>G 并没有影响 *HAND2* 基因启动子转录活性 ($P > 0.05$), 见表 3。

2.3 罕见变异对转录因子结合的影响

使用含有上述罕见变异的探针进行 EMSA, 分析罕见变异对转录因子结合的影响。结果提示, g.173531213C>G 在 H9C2 细胞中产生了 1 个转录因子结合位点, 见图 2。

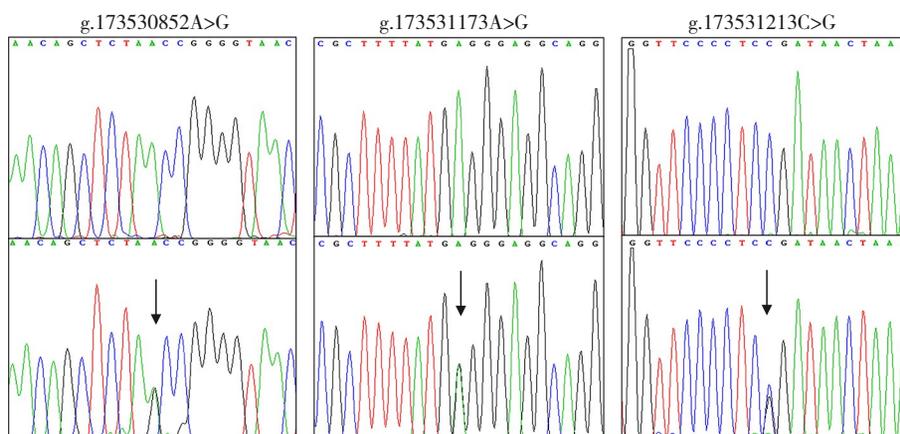


图 1 *HAND2* 基因启动子罕见变异的测序色谱图 箭头所标为变异位点。

表 1 10 例 *HAND2* 基因启动子区变异患儿的临床资料

编号	变异位点*	性别	年龄(岁)	缺损类型	是否含有其他变异位点
1	g.173530852A>G	男	3	膜周部缺损	否
2	g.173531173A>G	男	4	膜周部缺损	否
3	g.173531213C>G	女	2	膜周部缺损	否
4	g.173531213C>G	男	3	膜周部缺损	否
5	g.173530852A>G	女	2	肌部缺损	含有 1 个常见变异
6	g.173531213C>G	男	4	膜部缺损	含有 2 个常见变异
7	g.173531213C>G	女	1	基底部缺损并膜部瘤形成	含有 1 个常见变异
8	g.173531213C>G	女	2	膜周部缺损	含有 2 个常见变异
9	g.173531213C>G	男	3	基底部缺损并膜部瘤形成	含有 1 个常见变异
10	g.173531213C>G	男	3	膜周部缺损	含有 1 个常见变异

注: *专指本研究中 3 个罕见变异位点。

表2 VSD 组和健康对照组罕见变异的分布情况

[例 (%)]

变异位点/基因型	位置 (bp)*	健康对照组 (n=345)	VSD 组 (n=349)	P 值
g.173530852A>G	-623			
AA		345(100)	347(99.4)	0.499
AG		0(0)	2(0.6)	
g.173531173A>G	-944			
AA		345(100)	348(99.7)	1.000
AG		0(0)	1(0.3)	
g.173531213C>G	-984			
CC		345(100)	342(98.0)	0.015
CG		0(0)	7(2.0)	

注：*变异位于 *HAND2* 基因转录起始位点 g.173530229 (NC_000004.12) 的上游。

表3 罕见变异对 *HAND2* 基因启动子转录活性的影响

($\bar{x} \pm s$)

重组质粒组别	相对转录活性	t 值*	P 值*
pGL3-WT 组	1.00 ± 0	-	-
pGL3-Basic 组	0.13 ± 0.01	98.271	<0.001
pGL3-173530852G 组	0.97 ± 0.01	3.779	0.063
pGL3-173531173G 组	1.03 ± 0.02	2.219	0.157
pGL3-173531213G 组	0.80 ± 0.02	16.086	0.004

注：pGL3-Basic 为空白对照。*设定 pGL3-WT (野生型) 的相对转录活性为 1。分别将各组相对转录活性与 pGL3-WT 组比较，并进行两样本 t 检验，P<0.05 表示差异有统计学意义。

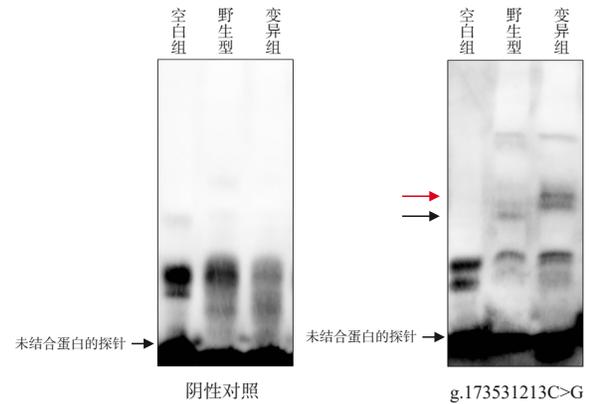


图2 g.173531213C>G 的 EMSA 结果 受影响的未知转录因子的结合用箭头标记 (变异组为红色箭头, 野生组为黑色箭头); 空白组没有加入蛋白质, 作为空白对照; g.173530852A>G 和 g.173531173A>G 的 EMSA 结果均为阴性, 选择其中之一作为阴性对照。

2.4 转录因子预测

TRANSFAC 和 JASPAR 转录因子数据库的预测结果提示, g.173531213C>G 可能产生了 1 个早期 B 细胞因子 3 (early B-cell factor 3, EBF3)、NK2 同源框 (NK2 homeobox 1, NKX2-1)、剪接因子 1 (splicing factor 1, SF1) 等转录因子结合的位点, 见表 4、图 3。

表4 g.173531213C>G 的探针序列

野生组探针序列	变异组探针序列	序列位置
5'-ttaatggtcccctc C gataactaaacctg-3'	5'-ttaatggtcccctc G gataactaaacctg-3'	173531228-173531199

注：字体加粗加大的碱基为变异位点；序列位置来源于 NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)。

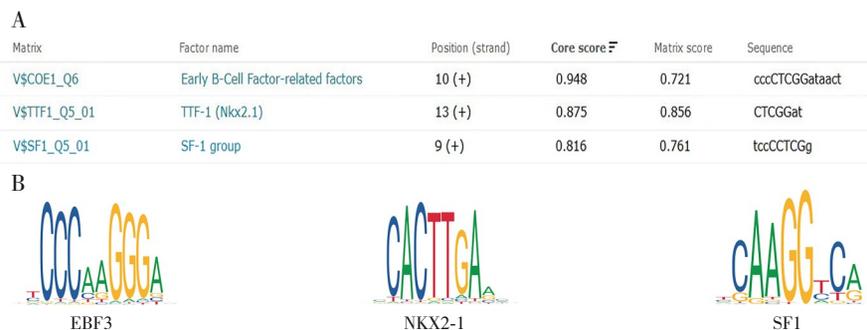


图3 所预测转录因子的结合力得分和结合位点图 A 为 TRANSFAC 中所预测转录因子结合力得分 (只包含 core score>80 的转录因子); B 为所预测转录因子在 JASPAR 中的结合位点图。

3 讨论

在人的心室和心房基本结构形成之后，即胚胎发育的第四周末，心室和心房开始分隔。心室的分隔起源于心尖部。先在心尖部形成心肌隆起，并向上生长，最终在心内膜垫下方停止，形成室间隔肌部，同时留下室间孔。之后心内膜垫向下生长，与来自肺动脉隔的延伸部分共同形成室间隔膜部，并填充室间孔^[9, 21-23]。来自第二生心区的细胞参与了这一过程，而 *HAND2* 基因则直接参与了对第二生心区发生发展的调控。同时有研究也证明，*HAND2* 基因在心脏发育阶段的表达降低或缺失，和 VSD 的发生发展有着显著的相关性^[15-17]。启动子是调控基因转录的关键元件，同时罕见变异对疾病发生发展的影响也越来越被重视。我们推测，*HAND2* 基因启动子区的罕见变异是导致 *HAND2* 基因表达降低甚至缺失的原因之一。为此，我们通过病例对照研究，试图发现 VSD 患儿 *HAND2* 基因启动子区的罕见变异，并尝试探究其对启动子的功能影响和相关的分子机制。

本研究中，我们一共发现了3个罕见变异，即 g.173530852A>G、g.173531173A>G 和 g.173531213C>G，其中 g.173531213C>G 在 VSD 组和健康对照组的分布差异有统计学意义。通过分析这3个罕见变异对 *HAND2* 基因启动子功能的影响，我们发现 g.173531213C>G 降低了 *HAND2* 基因启动子的转录活性，而 g.173530852A>G 和 g.173531173A>G 并没有影响启动子功能。EMSA 结果提示，g.173531213C>G 产生了1个新的转录因子结合位点。随后对转录因子进行预测，发现 g.173531213C>G 可能产生了1个 EBF3、NKX2-1、SF1 等转录因子结合的位点。其中，转录因子 EBF3 主要通过调控与细胞周期和凋亡相关的基因，进而参与细胞的生长；还可影响 B 细胞分化、骨发育和神经发生，也具有肿瘤抑制因子的作用^[24]。转录因子 NKX2-1 主要调节与形态发生有关的基因表达，目前对该基因的研究主要集中在先天性甲状腺功能减退症、新生儿呼吸窘迫及甲状腺肿瘤和肺部肿瘤等领域^[25]。转录因子 SF1 除了结合下游靶基因启动子调控转录外，还能够特异性识别 3' 剪接位点的内含子分支点序列，进而调控选择性剪接^[26]。

总的来说，我们在 VSD 患儿中发现了3个罕见变异，通过功能分析和分子机制探索，进一步明确了这些罕见变异对 VSD 发生发展的作用。这为

进一步了解 VSD 的遗传学病因和 *HAND2* 基因的调控机制提供了参考。由于技术和成本等多种原因，我们未能进一步深入研究。随着技术的提高，后续我们将完善相关实验，为 *HAND2* 基因对 VSD 形成的分子机制提供更充分的依据。

利益冲突声明：所有作者声明无任何利益冲突。

[参 考 文 献]

- [1] Tsao CW, Aday AW, Almarzooq ZI, et al. Heart disease and stroke statistics—2022 update: a report from the American Heart Association[J]. *Circulation*, 2022, 145(8): e153-e639. PMID: 35078371. DOI: 10.1161/CIR.0000000000001052.
- [2] Muto M, Sugita K, Matsuba T, et al. How should we treat representative neonatal surgical diseases with congenital heart disease? [J]. *Pediatr Surg Int*, 2022, 38(9): 1235-1240. PMID: 35838788. DOI: 10.1007/s00383-022-05178-z.
- [3] Luo M, Wang T, Huang P, et al. Association of maternal betaine-homocysteine methyltransferase (*BHMT*) and *BHMT2* genes polymorphisms with congenital heart disease in offspring[J]. *Reprod Sci*, 2023, 30(1): 309-325. PMID: 35835902. DOI: 10.1007/s43032-022-01029-3.
- [4] George RM, Firulli AB. Hand factors in cardiac development[J]. *Anat Rec (Hoboken)*, 2019, 302(1): 101-107. PMID: 30288953. PMID: PMC6312500. DOI: 10.1002/ar.23910.
- [5] Morton SU, Quiat D, Seidman JG, et al. Genomic frontiers in congenital heart disease[J]. *Nat Rev Cardiol*, 2022, 19(1): 26-42. PMID: 34272501. PMID: PMC9236191. DOI: 10.1038/s41569-021-00587-4.
- [6] Bruneau BG. Signaling and transcriptional networks in heart development and regeneration[J]. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2013, 5(3): a008292. PMID: 23457256. PMID: PMC3578359. DOI: 10.1101/cshperspect.a008292.
- [7] Meilhac SM, Buckingham ME. The deployment of cell lineages that form the mammalian heart[J]. *Nat Rev Cardiol*, 2018, 15(11): 705-724. PMID: 30266935. DOI: 10.1038/s41569-018-0086-9.
- [8] Zhao K, Yang Z. The second heart field: the first 20 years[J]. *Mamm Genome*, 2022. Epub ahead of print. PMID: 36550326. DOI: 10.1007/s00335-022-09975-8.
- [9] Moore-Morris T, van Vliet PP, Andelfinger G, et al. Role of epigenetics in cardiac development and congenital diseases[J]. *Physiol Rev*, 2018, 98(4): 2453-2475. PMID: 30156497. DOI: 10.1152/physrev.00048.2017.
- [10] Vincentz JW, Toolan KP, Zhang W, et al. Hand factor ablation causes defective left ventricular chamber development and compromised adult cardiac function[J]. *PLoS Genet*, 2017, 13(7): e1006922. PMID: 28732025. PMID: PMC5544250. DOI: 10.1371/journal.pgen.1006922.

- [11] Firulli AB, McFadden DG, Lin Q, et al. Heart and extra-embryonic mesodermal defects in mouse embryos lacking the bHLH transcription factor Hand1[J]. *Nat Genet*, 1998, 18(3): 266-270. PMID: 9500550. DOI: 10.1038/ng0398-266.
- [12] Srivastava D, Thomas T, Lin Q, et al. Regulation of cardiac mesodermal and neural crest development by the bHLH transcription factor, dHAND[J]. *Nat Genet*, 1997, 16(2): 154-160. PMID: 9171826. DOI: 10.1038/ng0697-154.
- [13] Ritter O, Haase H, Schulte HD, et al. Remodeling of the hypertrophied human myocardium by cardiac bHLH transcription factors[J]. *J Cell Biochem*, 1999, 74(4): 551-561. PMID: 10440925. DOI: 10.1002/(sici)1097-4644(19990915)74:4<551::aid-jcb5>3.3.co;2-0.
- [14] Tsuchihashi T, Maeda J, Shin CH, et al. *Hand2* function in second heart field progenitors is essential for cardiogenesis[J]. *Dev Biol*, 2011, 351(1): 62-69. PMID: 21185281. PMID: PMC3039109. DOI: 10.1016/j.ydbio.2010.12.023.
- [15] Shen L, Li XF, Shen AD, et al. Transcription factor *HAND2* mutations in sporadic Chinese patients with congenital heart disease[J]. *Chin Med J (Engl)*, 2010, 123(13): 1623-1627. PMID: 20819618.
- [16] Sun YM, Wang J, Qiu XB, et al. A *HAND2* loss-of-function mutation causes familial ventricular septal defect and pulmonary stenosis[J]. *G3 (Bethesda)*, 2016, 6(4): 987-992. PMID: 26865696. PMID: PMC4825666. DOI: 10.1534/g3.115.026518.
- [17] Vincentz JW, Firulli BA, Toolan KP, et al. *HAND* transcription factors cooperatively specify the aorta and pulmonary trunk[J]. *Dev Biol*, 2021, 476: 1-10. PMID: 33757801. PMID: PMC8172455. DOI: 10.1016/j.ydbio.2021.03.011.
- [18] Kuchenbaecker K, Appel EVR. Assessing rare variation in complex traits[J]. *Methods Mol Biol*, 2018, 1793: 51-71. PMID: 29876891. DOI: 10.1007/978-1-4939-7868-7_5.
- [19] Auer PL, Lettre G. Rare variant association studies: considerations, challenges and opportunities[J]. *Genome Med*, 2015, 7(1): 16. PMID: 25709717. PMID: PMC4337325. DOI: 10.1186/s13073-015-0138-2.
- [20] Chen W, Coombes BJ, Larson NB. Recent advances and challenges of rare variant association analysis in the biobank sequencing era[J]. *Front Genet*, 2022, 13: 1014947. PMID: 36276986. PMID: PMC9582646. DOI: 10.3389/fgene.2022.1014947.
- [21] Moorman AF, Christoffels VM. Cardiac chamber formation: development, genes, and evolution[J]. *Physiol Rev*, 2003, 83(4): 1223-1267. PMID: 14506305. DOI: 10.1152/physrev.00006.2003.
- [22] Harris IS, Black BL. Development of the endocardium[J]. *Pediatr Cardiol*, 2010, 31(3): 391-399. PMID: 20135106. PMID: PMC2836465. DOI: 10.1007/s00246-010-9642-8.
- [23] Poelmann RE, Gittenberger-de Groot AC. Development and evolution of the metazoan heart[J]. *Dev Dyn*, 2019, 248(8): 634-656. PMID: 31063648. PMID: PMC6767493. DOI: 10.1002/dvdy.45.
- [24] Tanaka AJ, Cho MT, Willaert R, et al. *De novo* variants in *EBF3* are associated with hypotonia, developmental delay, intellectual disability, and autism[J]. *Cold Spring Harb Mol Case Stud*, 2017, 3(6): a002097. PMID: 29162653. PMID: PMC5701309. DOI: 10.1101/mcs.a002097.
- [25] Yang L, Lin M, Ruan WJ, et al. *Nkx2-1*: a novel tumor biomarker of lung cancer[J]. *J Zhejiang Univ Sci B*, 2012, 13(11): 855-866. PMID: 23125078. PMID: PMC3494024. DOI: 10.1631/jzus.B1100382.
- [26] Nameki N, Takizawa M, Suzuki T, et al. Structural basis for the interaction between the first SURP domain of the SF3A1 subunit in U2 snRNP and the human splicing factor SF1[J]. *Protein Sci*, 2022, 31(10): e4437. PMID: 36173164. PMID: PMC9514218. DOI: 10.1002/pro.4437.

(本文编辑: 王颖)