

γ -氨基丁酸代谢影响拟南芥叶片节律性运动

陈意¹, 岳涵², 向宇³, 余光辉^{1,2,3,*}

¹中南民族大学生命科学院, 中国蔬菜研究所, 武汉430074

²中南民族大学生命科学院, 武陵山区特色资源植物种质保护与利用湖北省重点实验室, 武汉430074

³中南民族大学生命科学院, 南方少数民族地区资源保护综合利用联合工程中心, 武汉430074

摘要: 为阐明 γ -氨基丁酸(γ -aminobutyric acid, GABA)和生物节律调控的关系, 本文以GABA合成(谷氨酸脱羧酶*gad*等)和代谢(GABA转氨酶GABA-T/*pop2*、谷氨酸脱氢酶*gdh*等)突变体, 以拟南芥叶片节律性运动为监测指标, 探讨了GABA代谢与叶片节律性运动的关系。结果显示, GABA合成突变体(*gad1-3*)和双突变体*gad1/gad2*中叶片节律性运动的振幅低于野生型, 在*gad1*、*gad2*和*gad1/gad2*中叶片运动的振幅变化明显; *pop2*突变体中, 叶片运动的节律性变化的振幅明显低于对照, *gdh1/gdh2*突变体中, 叶片运动呈现非节律性变化的特点; 此外, 外源 γ -氨基丁酸($1.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)不同程度提高拟南芥3种生态型(Col、Ler、Ws)叶片节律性运动的振幅, 其中Col生态型和Ws生态型叶片振幅变化明显; 在生物钟核心基因突变体*toc1*、*lhy*、*cca1*中, 叶片运动呈现非节律性变化模式; 但外源GABA的添加能够提高这些突变体叶片节律性运动的振幅或者恢复叶片的节律性。上述结果表明GABA代谢平衡直接和间接影响生物钟节律, 外源或内源GABA的合成或代谢突变主要影响到叶片节律性运动的振幅。

关键词: γ -氨基丁酸; 生物节律; 叶片运动; GABA代谢; 拟南芥

生物节律(biological rhythm)在植物生命过程中扮演着非常重要的角色(Nagel和Kay 2012), 其内在的精细调节机制使植物能够根据周期性外界环境的变化来协调自身的各种生理过程, 从而适应环境诸如光照和温度的节律变化。生物的行为如叶片的节律性运动等以及细胞内部的生理变化也受到昼夜节律的控制(Hubbard和Dodd 2016)。

高等植物的生物钟能够调节许多代谢途径(Nagel和Kay 2012)。研究表明生物钟控制着光合作用活性、下胚轴的节律性生长、激素应答、营养吸收和基因表达的日常变化(Fukushima等2009; Wang等2011)。植物昼夜节律系统是由输入途径(input pathway)、核心振荡器(core oscillator)和输出途径(output pathway)三部分组成的相互调控的反馈环路(Nagel和Kay 2012; Hubbard和Dodd 2016), 其核心振荡器主要由*TOC1 (TIMING OF CAB EXPRESSION 1)*、*CCA1 (CIRCADIAN CLOCK-ASSOCIATED 1)*和*LHY (LATE ELONGATED HYPOCOTYL)*三个核心元件组成, 核心振荡器与其他相关的生物节律调节元件构成了互相调节的复杂调控网络(Adams和Carré 2011; Nagel和Kay 2012)。在拟南芥基因组中大约1/3的基因受到昼夜节律的调控(Covington等2008)。近年来的研究显示了植物体内的代谢产物如葡萄糖、活性氧等的产生和生物

节律存在着相互调控的关系(Blasing等2005; Farré和Weise 2012)。

γ -氨基丁酸(γ -aminobutyric acid, GABA)是一种抑制性神经递质。植物领域的研究表明GABA是一种参与植物发育和响应胁迫的重要代谢物质和信号分子(Liu等2011; Yu等2014)。GABA的合成由谷氨酸脱羧酶(glutamate decarboxylase, GAD)催化谷氨酸脱羧形成(Michaeli和Fromm 2015; Shelp和Zarei 2017), 拟南芥中GAD主要由5种*GAD*基因编码。GABA的氧化首先通过GABA转氨酶(GABA transaminase, GABA-T, POP2)的催化发生转氨作用, 形成琥珀酸半醛后进入三羧酸循环(Michaeli和Fromm 2015; Shelp和Zarei 2017; Koch等2017)。上述反应和 α -酮戊二酸的氧化一起构成GABA支路, 该支路中分别涉及谷氨酸脱羧酶(GAD)、 γ -氨基丁酸转氨酶(GABA-T)和琥珀酸半醛脱氢酶(succinic semialdehyde dehydrogenase, SSADH) (Michaeli和Fromm 2015; Shelp和Zarei 2017; Koch等2017)。同时, α -酮戊二酸经由谷氨酸脱氢酶(glutamate dehydrogenase, GDH)催化可转变为谷氨酸, 同时又构成了谷氨酸、 α -酮戊二酸和 γ -氨基丁酸相互调节的回路。

收稿 2018-03-08 修定 2018-07-27

资助 国家自然科学基金(31270361)。

* 通讯作者(yusheen@163.com)。

植物的生物钟功能与三羧酸循环存在着密切的调控关系(Fukushima等2009; Nakamichi等2009)。叶片的节律性运动是拟南芥生物节律重要的输出特征(Edwards和Millar 2007; Greenham等2015; Müller和Jiménez-Gómez 2016)。拟南芥2周龄相互对生的2片幼叶具有明显的生物节律性运动的特性,在很大程度上能够反映细胞代谢的内在生理变化(Edwards和Millar 2007; Dornbusch等2014; Greenham等2015; Müller和Jiménez-Gómez 2016)。为研究 γ -氨基丁酸(GABA)代谢和生物节律的内在调控关系,本论文以GABA合成(谷氨酸脱羧酶*gad*等)和代谢(GABA转氨酶GABA-T/*pop2*、谷氨酸脱氢酶*gdh*等)突变体为材料,以拟南芥叶片的节律性运动为监测指标,探讨GABA代谢和生物节律互作调控的潜在机制。

1 材料与方法

1.1 拟南芥材料

拟南芥(*Arabidopsis thaliana* L.)种子有Columbia (Col)、Landsberg *erecta* (Ler)和Wassilewskija (Ws) 3种野生生态型,相关突变体具体如下: Col生态型*gad*突变体材料(*gad1-3*突变体和*gad1/gad2*双突变体)、Col生态型谷氨酸脱氢酶(GDH)突变体材料*gdh1/gdh2*、Col生态型*cca1*突变体(拟南芥昼夜节律核心基因突变体材料), Ler生态型*pop2*突变体(pollen-pistil incompatibility), Ws生态型*toc1*、*lhy*突变体、*cca1/lhy*双突变体和*cca1/toc1*双突变体。以上*gad1*、*gad2*、*gad3*突变体和*gad1/gad2*双突变体由加拿大University of Guelph的Barry Shelp教授提供, *gdh1/gdh2*突变体材料由英国University of Warwick的Isabelle Carre教授提供; *pop2*突变体材料和拟南芥昼夜节律核心基因突变体材料购自欧洲种子中心。

1.2 材料培养

种子用氯气消毒氧化杀菌3~4 h。在超净工作台中,用灭菌的竹签将种子分别接种于1/2MS和1/2MS+1.0 mmol·L⁻¹ GABA(不含蔗糖, pH为5.8)的方形塑料培养皿(10 cm×10 cm)上,用透气型胶带(3M Micropore™)密封,放置于4°C冰箱春化2 d,然后取出放置于温室(16 h/8 h光/暗循环,温度为22°C)中培养。

1.3 叶片节律性运动的实时观察

叶片伸展运动的节律性观察按照已报道的方法进行(Edwards和Millar 2007; Greenham等2015; Müller和Jiménez-Gómez 2016)。在超净工作台上选取长出有2片幼叶的拟南芥,用锋利刀片将幼苗和固体培养基一起切割下来,将培养基和幼苗一起放置在竖立的带小格子的方形培养皿(5 cm×5 cm)上,注意2片叶片必须侧面正立对着方形培养皿盖板(图1-A),然后用封口膜封口。设置延时相机(Brinno, 产地台湾)参数,将切割转移好的拟南芥放在培养室里进行持续实时拍照(图1-B)。根据相机中记录的叶片上下运动的影像数据,然后用Imaging J软件分析叶片节律性运动的规律(图1-C)。

2 实验结果

2.1 内源性GABA合成突变体叶片节律性变化

谷氨酸脱羧酶(GAD)是控制GABA合成的关键酶,拟南芥中有多种GAD (*GAD1*~*5*),它们特异分布在拟南芥不同部位。为研究内源性GABA合成缺陷是否影响叶片运动的节律性变化,本研究用已构建好的*gad1-3*单突变体和*gad1/gad2*双突变体为材料,基于叶片上下运动的追踪记录研究叶片节律性变化的规律(图1)。结果表明,在叶片运动观察的早期,*gad1*突变体的叶片节律性运动的振幅明显低于野生型(图2-A),类似的现象在*gad2*突变体也观察到(图2-B);在*gad3*突变体中叶片的节律性运动的振幅和对照相比无显著差异(图2-C);在*gad1/gad2*双突变体叶片的节律性运动振幅也明显低于对照(图2-D)。表明内源性GABA合成缺陷不同程度地影响着叶片节律性运动的振幅。

2.2 内源性GABA代谢突变体叶片节律性变化

POP2 (pollen-pistil incompatibility)是编码GABA代谢过程中第一个关键酶—— γ -氨基丁酸转氨酶(GABA-T/*POP2*)的基因。*POP2*突变导致内源性GABA含量增高。结果显示,*pop2*突变体中叶片节律性运动的振幅低于野生型(图3-A)。表明内源性GABA含量增加影响叶片运动节律的振幅,与时相变化无关。

谷氨酸脱氢酶(GDH)是催化氨还原性地固定到 α -酮戊二酸上,形成GABA合成的前体物谷氨酸反应的酶,在拟南芥茎和叶伴胞细胞线粒体中特

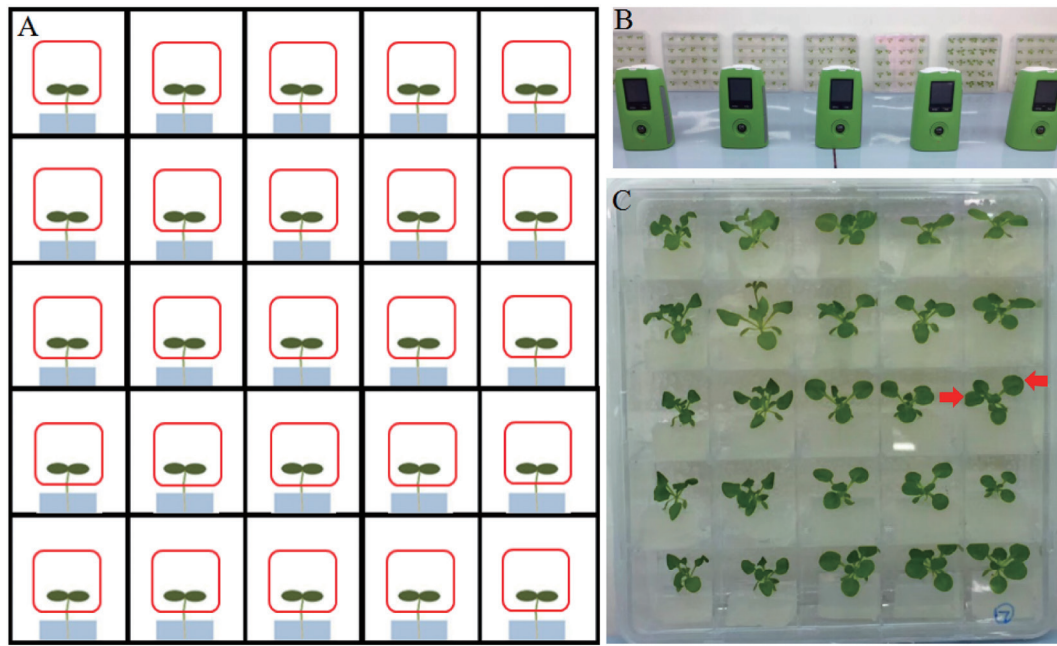


图1 叶片运动实验操作示意图

Fig.1 Sketch map of leaf movement experimental operation

A: 将生长2周后的方形培养皿中拟南芥幼苗连同培养基一起切割转移至带小格子的方形培养皿中, 保持幼叶的姿势在拍摄取景范围内(红色方框显示); B: 延时摄影相机拍摄拟南芥叶片上下运动的图像; C: 使用Imaging J软件分析单个拟南芥叶片节律性运动变化的规律(红色箭头所示)。

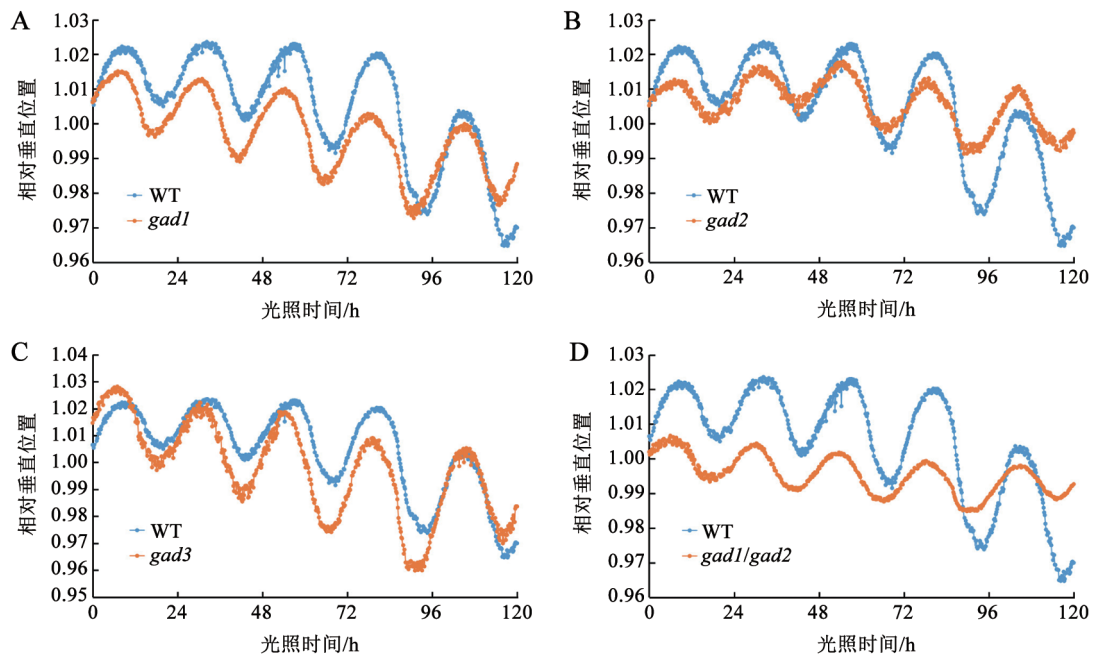


图2 内源性GABA合成突变体中叶片的节律性变化

Fig.2 Rhythmic changes of leaves in mutants of endogenous GABA biosynthesis

A: *gad1*突变体与野生型拟南芥的叶片节律性运动; B: *gad2*突变体与野生型拟南芥的叶片节律性运动; C: *gad3*突变体与野生型拟南芥的叶片节律性运动; D: *gad1/gad2*突变体与野生型拟南芥的叶片节律性运动。

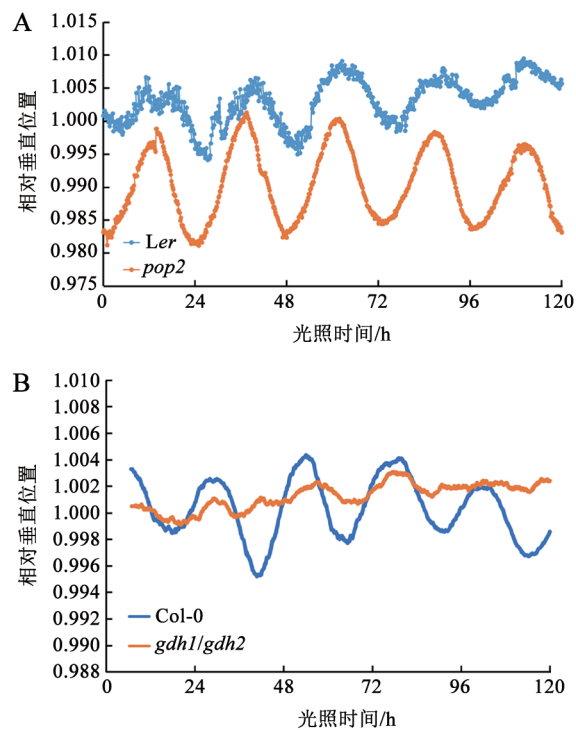


图3 内源性GABA代谢突变体中叶片的节律性变化

Fig.3 Rhythmic changes of leaves in mutants of endogenous GABA catabolism

A: *pop2*突变体与Ler野生生态型拟南芥的叶片节律性运动; B: *gdh1/gdh2*突变体与Col野生生态型拟南芥叶片节律性运动。

异存在。此外GDH能够可逆催化谷氨酸生成 α -酮戊二酸, GDH双突变体(*gdh1/gdh2*)的研究表明, *gdh1/gdh2*双突变体叶片的节律性变化振幅低于对照, 且表现出非节律性运动的模式(图3-B)。

2.3 外源性GABA与叶片节律性变化的调控

研究表明, 拟南芥3种野生生态型(Col、Ler、Ws)在含有 $1.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ GABA的培养基和不含有GABA的培养基中叶片运动节律不同。外源GABA能够影响3种生态型叶片节律性运动的振幅(图4), 不同的是, Col生态型和Ws生态型的拟南芥在添加外源性GABA的情况下, 叶片节律性运动的振幅显著高于对照(图4-A和B), 而Ler生态型在添加外源性GABA后, 叶片节律性运动的振幅略有增加(图4-C)。

2.4 生物钟节律核心基因突变体中叶片的节律性变化与GABA的调控关系

以生物节律核心元件基因的突变体为材料, 进一步研究GABA和叶片节律性运动的调控关系。

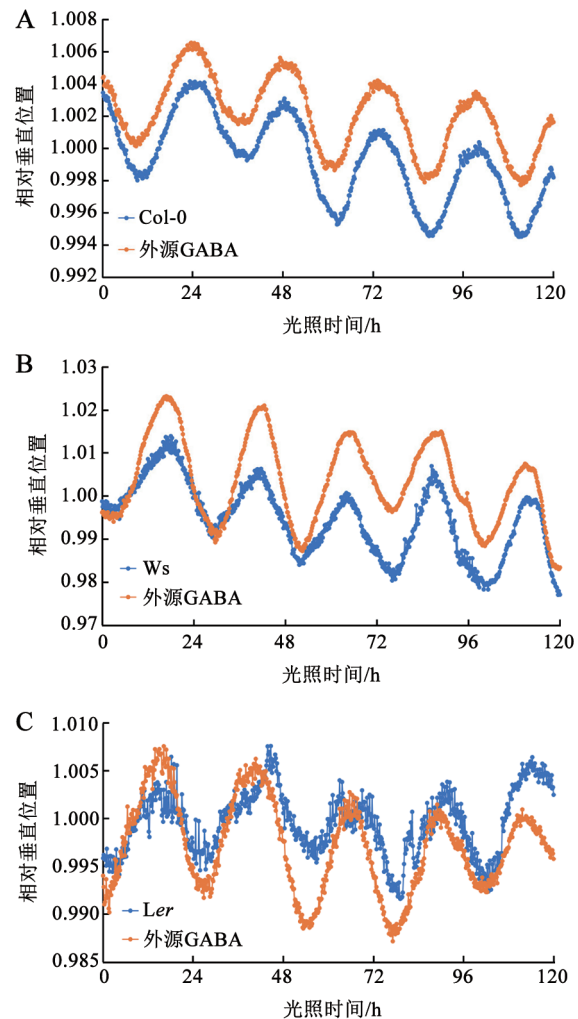


图4 外源性GABA对3种生态型拟南芥叶片的节律性变化的影响

Fig.4 Effects of exogenous GABA on leaf rhythmic movements in three ecotypes of *Arabidopsis*

A: Col生态型; B: Ws生态型; C: Ler生态型。

与对照相比, *toc1*突变体的叶片运动呈现非节律性(图5-A); 值得注意的是, 在添加外源GABA情况下, *toc1*突变体叶片运动的模式发生了显著变化, 叶片运动呈现出节律性(图5-B); 在*lhy*突变体(图5-C和D)和*cca1*突变体(图5-E和F)中也观察到类似的现象, 即添加外源GABA在一定程度上恢复了叶片节律性运动(图5-D和F), 表明了GABA在节律性运动中起着重要的调节作用。

与野生型相比, 在*cca1/lhy*双突变体中叶片的运动呈现非节律性变化(图6-A), 外源性GABA的添加并不影响*cca1/lhy*双突变体非节律性变化的模

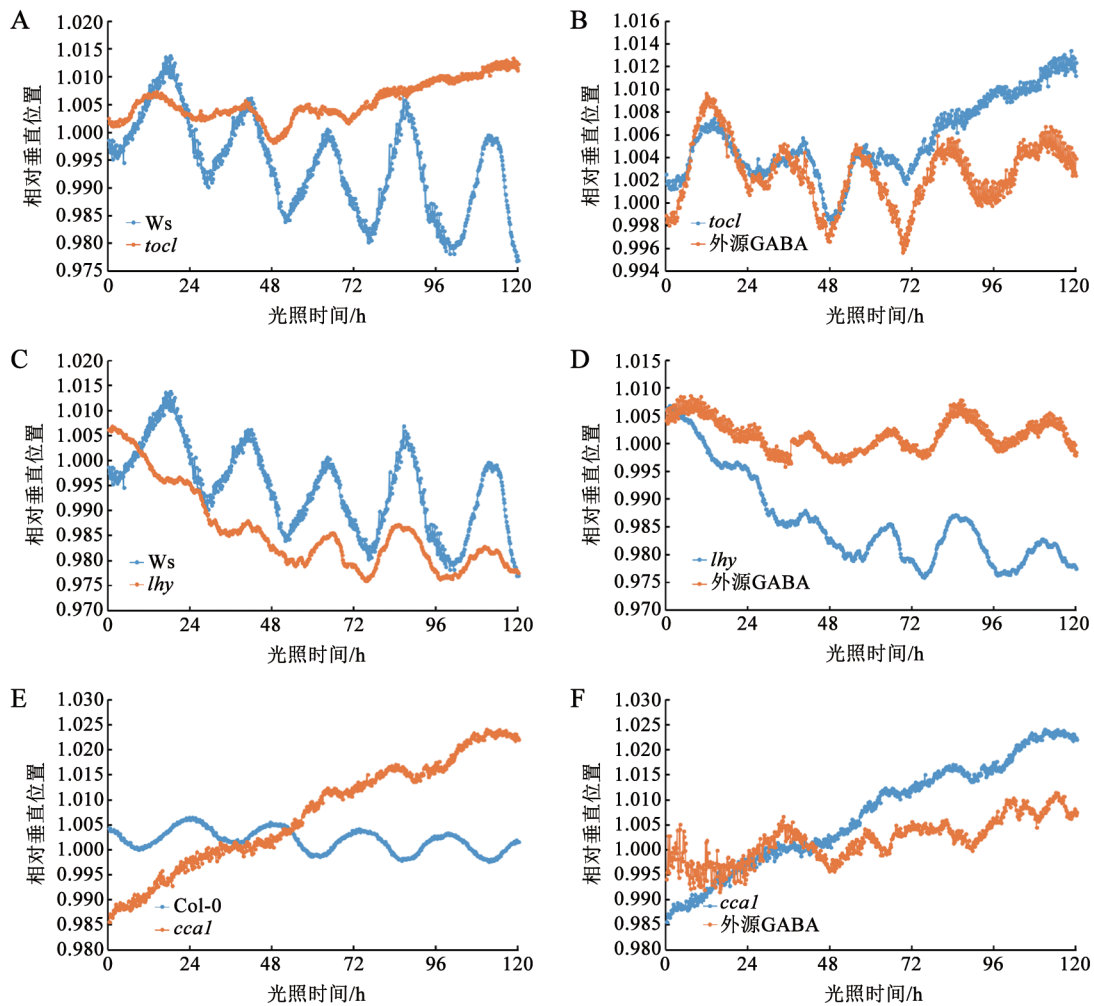


图5 拟南芥昼夜节律核心基因突变体中叶片运动的变化

Fig.5 Leaf movement in the mutants of core circadian genes in *Arabidopsis*

A: *tocl*突变体拟南芥与Ws生态型; B: 外源性GABA对*tocl*突变体叶片运动的影响; C: *lhy*突变体拟南芥与Ws生态型; D: 外源性GABA对*lhy*突变体叶片运动的影响; E: *cca1*突变体拟南芥与Col生态型; F: 外源性GABA对*cca1*突变体叶片运动的影响。

式,但在一定程度上增加了非节律性变化的振幅(图6-B);在*cca1/tocl*双突变体中叶片的运动呈现节律性变化,但节律性变化的时相滞后于对照(图6-C),外源GABA的添加提高了*cca1/tocl*双突变体叶片运动的振幅(图6-D)。上述结果表明在生物钟核心基因双突变体中,外源性GABA的添加并不能改变叶片的非节律性运动的模式。

3 讨论

γ -氨基丁酸(GABA)作为一种潜在的信号分子和代谢产物参与了细胞内pH环境的调节、碳(C)/氮(N)营养平衡、抑制昆虫啃食等各种生理生化反应(Fait等2008)。此外,GABA还参与了花粉管生

长的调控(Yu等2014)等。本论文用成功构建的*gad1-3*单突变体和*gad1/gad2*双突变体以及GABA代谢突变体,分析了 γ -氨基丁酸(GABA)代谢对拟南芥叶片节律性运动变化的影响。结果表明,无论GABA合成突变(*gad*等突变体)还是代谢突变(*pop2*等突变体)都不同程度地影响叶片节律性运动的模式,叶片节律性变化的振幅明显低于对照,表明了GABA正常代谢的平衡是叶片节律性变化模式所必需的。考虑到GABA代谢和三羧酸循环的密切关系,推测GABA的正常代谢对于生物节律的维持起着重要的作用。

生物节律核心元件基因的突变体(*tocl*、*lhy*、*cca1*等)的实验进一步明确了GABA对生物节律调

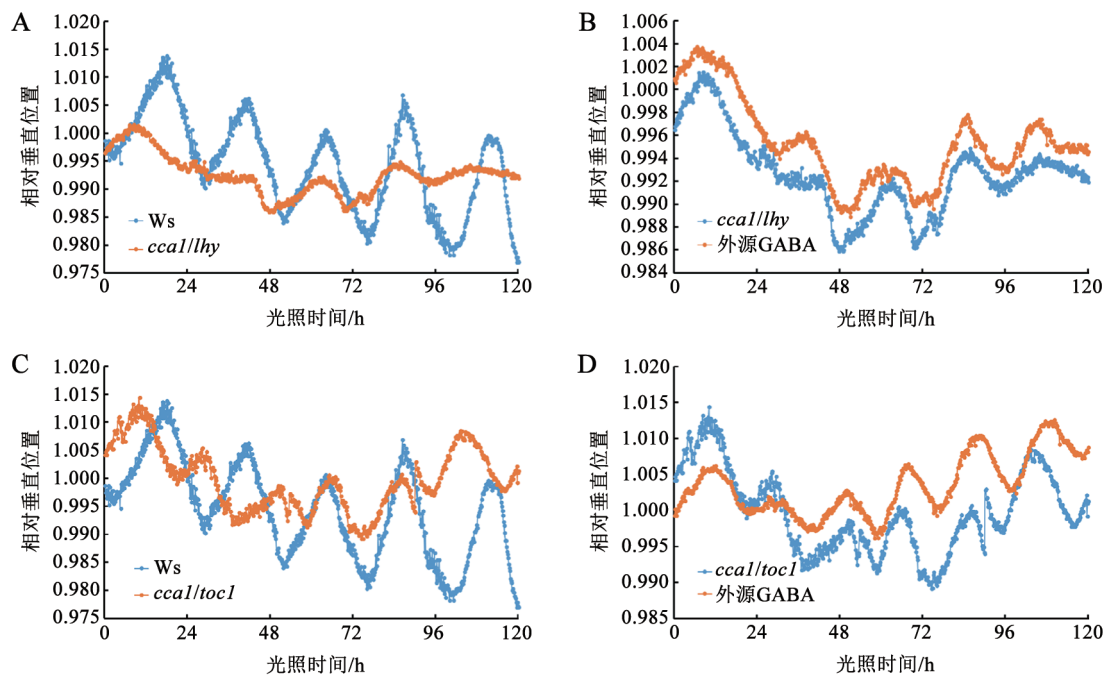


图6 拟南芥昼夜节律核心基因双突变体中叶片运动的变化

Fig.6 Leaf movement in the double mutants of core circadian genes in *Arabidopsis*

A: *cca1/lhy*双突变拟南芥与Ws生态型; B: 外源性GABA对*cca1/lhy*双突变体拟南芥叶片节律性运动的影响; C: *cca1/toc1*双突变体拟南芥与Ws生态型; D: 外源性GABA对*cca1/toc1*双突变体拟南芥叶片节律性运动的影响。

控之间的关系。在这些突变体中,叶片运动的模式呈现非节律性变化;但值得注意的是,外源GABA的添加能够提高双突变体叶片非节律性运动的振幅,能够部分恢复单突变体叶片的节律性变化,这一结果充分表明GABA代谢和生物钟节律基因之间存在着直接和间接的调控关系。

动、植物研究表明生物体内在的生物钟节律调控着机体的生理功能和代谢过程,而代谢过程的中间产物反过来又调节生物钟节律(Asher和Sassone-Corsi 2015; Kinmonth-Schultz等2013)。尽管GABA代谢和生物节律基因互作调控叶片节律性运动的内在机制尚未清晰,但目前的研究表明GABA正常代谢和叶片的节律性运动存在着相应的调控关系。越来越多的证据表明,代谢过程的初级代谢物、能量代谢和活性氧、 NAD^+ 等都对生物节律施加影响(Zhou等2015)。本研究发现谷氨酸脱氢酶突变体(*gdh1/gdh2*)中叶片的运动呈现非节律性变化,这可能与*gdh*突变体中氧化还原状态的改变有关(Tarassenko等2009)。

另外,外源性GABA的添加提高了叶片节律

性振动的振幅,并能恢复一些突变体叶片振动的模式。考虑到植物的生物钟节律对植物光合代谢产物积累、逆境胁迫响应、育种方面的重要作用(Greenham和McClung 2015),以及农作物驯化过程中影响开花的突变在节律性变化振幅的差异(Shor和Green 2016),有理由认为GABA代谢可能对生物钟节律调控施加影响,对其作用机理的深入研究有望成为提高作物产量的一种潜在途径。

参考文献(References)

- Adams S, Carré IA (2011). Downstream of the plant circadian clock: output pathways for the control of physiology and development. *Essays Biochem*, 49 (1): 53–69
- Asher G, Sassone-Corsi P (2015). Time for food: the intimate interplay between nutrition, metabolism, and the circadian clock. *Cell*, 161 (1): 84–92
- Bläsing OE, Gibon Y, Günther M, et al (2005). Sugars and circadian regulation make major contributions to the global regulation of diurnal gene expression in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 17 (12): 3257–3281
- Covington MF, Maloof JN, Straume M, et al (2008). Global transcriptome analysis reveals circadian regulation of key pathways in plant growth and development. *Genome Biol*, 9: R130

- Dornbusch T, Michaud O, Xenarios I, et al (2014). Differentially phased leaf growth and movements in *Arabidopsis* depend on coordinated circadian and light regulation. *Plant Cell*, 26 (10): 3911–3921
- Edwards KD, Millar AJ (2007). Analysis of circadian leaf movement rhythms in *Arabidopsis thaliana*. *Methods Mol Biol*, 362: 103–113
- Fait A, Fromm H, Walter D, et al (2008). Highway or byway: the metabolic role of the GABA shunt in plants. *Trends Plant Sci*, 13 (1): 14–19
- Farré EM, Weise SE (2012). The interactions between the circadian clock and primary metabolism. *Curr Opin Plant Biol*, 15 (3): 293–300
- Fukushima A, Kusano M, Nakamichi N, et al (2009). Impact of clock-associated *Arabidopsis* pseudo-response regulators in metabolic coordination. *Proc Natl Acad Sci USA*, 106: 7251–7256
- Greenham K, Lou P, Remsen SE, et al (2015). TRiP: tracking rhythms in plants, an automated leaf movement analysis program for circadian period estimation. *Plant Methods*, 11: 33
- Greenham K, McClung CR (2015). Integrating circadian dynamics with physiological processes in plants. *Nat Rev Genet*, 16 (10): 598–610
- Hubbard K, Dodd A (2016). Rhythms of life: the plant circadian clock. *Plant Cell*, 28 (4): 1–10
- Kinmonth-Schultz HA, Golembeski GS, Imaizumi T (2013). Circadian clock-regulated physiological outputs: dynamic responses in nature. *Semin Cell Dev Biol*, 24 (5): 407–413
- Koch I, Nöthen J, Schleiff E (2017). Modeling the metabolism of *Arabidopsis thaliana*: application of network decomposition and network reduction in the context of petri nets. *Front Genet*, 8: 85
- Liu CL, Li Zhao L, Yu GH (2011). The Dominant glutamic acid metabolic flux to produce γ -amino butyric acid over proline in *Nicotiana tabacum* leaves under water stress relates to its significant role in antioxidant activity. *J Integr Plant Biol*, 53 (8): 608–618
- Michaeli S, Fromm H (2015). Closing the loop on the GABA shunt in plants: are GABA metabolism and signaling entwined? *Front Plant Sci*, 6: 419
- Müller NA, Jiménez-Gómez JM (2016). Analysis of circadian leaf movements. *Methods Mol Biol*, 1398: 71–79
- Nagel DH, Kay SA (2012). Complexity in the wiring and regulation of plant circadian networks. *Curr Biol*, 22: R648–R657
- Nakamichi N, Fukushima A, Kusano M, et al (2009). Linkage between circadian clock and tricarboxylic acid cycle in *Arabidopsis*. *Plant Signal Behav*, 4 (7): 660–662
- Shelp BJ, Zarei A (2017). Subcellular compartmentation of 4-aminobutyrate (GABA) metabolism in *Arabidopsis*: an update. *Plant Signal Behav*, 12 (5): 1559–2324
- Shor E, Green RM (2016). The Impact of domestication on the circadian clock. *Trends Plant Sci*, 21 (4): 281–283
- Tarasenko VI, Garnik EY, Shmakov VN, et al (2009). Induction of *Arabidopsis gdh2* gene expression during changes in redox state of the mitochondrial respiratory chain. *Biochem (Mosc)*, 74 (1): 47–53
- Wang W, Barnaby JY, Tada Y, et al (2011). Timing of plant immune responses by a central circadian regulator. *Nature*, 470: 110–114
- Yu GH, Zou J, Feng J, et al (2014). Exogenous γ -aminobutyric acid (GABA) affects pollen tube growth via modulating putative Ca^{2+} -permeable membrane channels and is coupled with negative regulation on glutamate decarboxylase. *J Exp Bot*, 65 (10): 3235–3248
- Zhou M, Wang W, Karapetyan S, et al (2015). Redox rhythm reinforces the circadian clock to gate immune response. *Nature*, 523 (7561): 472–476

Effects of γ -aminobutyric acid metabolism on leaf rhythmic movement in *Arabidopsis thaliana*

CHEN Yi¹, YUE Han², XIANG Yu³, YU Guang-Hui^{1,2,3,*}

¹China Brasenia schreberi Research Institute, College of Life Sciences, South-Central University for Nationalities, Wuhan 430074, China

²Hubei Provincial Key Laboratory for Protection and Application of Special Plants in Wuling Area of China, College of Life Sciences, South-Central University for Nationalities, Wuhan 430074, China

³Engineering Research Centre for the Protection and Utilization of Bioresource in Ethnic Area of Southern China, College of Life Sciences, South-Central University for Nationalities, Wuhan 430074, China

Abstract: To elucidate the relationship between γ -aminobutyric acid (GABA) and circadian clock regulation, using rhythmic movement of *Arabidopsis* leaf as monitoring indicators, the mutants of GABA biosynthesis enzymes (glutamic acid decarboxylase, GAD) and catabolism enzymes (GABA transaminase, GABA-T/POP2 and glutamate dehydrogenase, GDH, etc.) were employed to explore the inherent interaction of GABA metabolism and biological rhythm. The results showed that in GABA biosynthetic mutant (*gad1-3*) and double mutant *gad1/gad2*, the amplitude of rhythmic movement of leaves was lower than that of wild type in different degrees, and the amplitude of leaf movement varied significantly in *gad1*, *gad2* and *gad1/gad2*. In *pop2* mutant, the amplitude of rhythmic change of leaf movement was significantly lower than that of control. In *gdh1/gdh2* mutant, leaf movement showed arrhythmic pattern. Furthermore, exogenous GABA (1.0 mmol·L⁻¹) could increase the amplitude of the rhythmic movement of the leaves in three ecotypes of *Arabidopsis thaliana* (Col, Ler, Ws) to different extent, and the amplitude had obvious changes in Col ecotype and Ws ecotype after GABA spraying. In *toc1*, *lhy* and *cca1* mutants, leaf movement showed arrhythmic change pattern, but exogenous GABA addition could increase the amplitude of rhythmic movement of these mutants or restore to the rhythmic movement of leaves. This results fully indicate that there is a direct or indirect governing relationship between the GABA metabolism and the circadian clock. These results also indicate that the balance of intracellular GABA metabolism has direct and indirect effect on circadian rhythm. Data herein show that exogenous GABA and its endogenous biosynthetic/metabolic mutants mainly affect the amplitude of leaf rhythmic movement.

Key words: γ -aminobutyric acid; circadian rhythm; leaf movement; GABA metabolism; *Arabidopsis thaliana*

Received 2018-03-08 Accepted 2018-07-27

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (31270361).

*Corresponding author (yusheen@163.com).