

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2022.02.013

益生菌对2型糖尿病患者恒定自然杀伤T细胞、血糖指标、炎症因子及肠道菌群的影响*

冯 罡¹, 仲威振¹, 赵 洁¹, 王晓丽^{2△}

(1. 青岛滨海学院附属医院内分泌代谢科, 山东 青岛 266000; 2. 浙江省立同德医院内分泌代谢科, 浙江 杭州 310012)

摘要:目的 探讨益生菌对2型糖尿病(T2DM)患者恒定自然杀伤T细胞、血糖指标、炎症因子及肠道菌群的影响。方法 选取青岛滨海学院附属医院和浙江省立同德医院2018年3月至2020年12月收治的T2DM患者102例,随机分为观察组和对照组,各51例。两组患者均予常规治疗,并口服盐酸二甲双胍缓释片、阿卡波糖片,观察组患者加用益生菌干预。两组均治疗8周。结果 观察组临床总有效率为94.12%,显著高于对照组的80.39%($P < 0.05$);观察组患者的恒定自然杀伤T(iNKT)细胞及白细胞介素4(IL-4)+iNKT比例均显著高于对照组,双歧杆菌及乳杆菌数量显著多于对照组, γ 干扰素(IFN- γ)+iNKT比例、空腹血糖、糖化血红蛋白、餐后2h血糖、超敏C反应蛋白、白细胞介素6及脂多糖水平均显著低于对照组,肠球菌数量及球杆菌数量均显著少于对照组($P < 0.05$);观察组与对照组不良反应发生率相当(11.76%比17.65%, $P > 0.05$)。结论 益生菌干预可改善T2DM患者的iNKT细胞水平、降低血糖和炎症因子水平,并改善肠道菌群失调状态。

关键词:2型糖尿病;益生菌;恒定自然杀伤T细胞;炎症因子;肠道菌群

中图分类号:R969.4;R977

文献标志码:A

文章编号:1006-4931(2022)02-0050-05

Effect of Probiotics on Invariant Natural Killer T Cells, Glycemic Indexes, Inflammatory Factors and Intestinal Flora in Patients with Type 2 Diabetes Mellitus

FENG Gang¹, ZHONG Weizhen¹, ZHAO Jie¹, WANG Xiaoli²

(1. Department of Endocrinology and Metabolism, Affiliated Hospital of Qingdao Binhai University, Qingdao, Shandong, China 266000; 2. Department of Endocrinology and Metabolism, Tongde Hospital of Zhejiang Province, Hangzhou, Zhejiang, China 310012)

Abstract: Objective To investigate the effect of probiotics on invariant natural killer T (iNKT) cells, glycemic indexes, inflammatory factors and intestinal flora in patients with type 2 diabetes mellitus (T2DM). **Methods** A total of 102 patients with T2DM admitted to the Affiliated Hospital of Qingdao Binhai University and the Tongde Hospital of Zhejiang Province from March 2018 to December 2020 were selected and randomly divided into the observation group and the control group, with 51 cases in each group. The patients in the two groups were given routine treatment, oral administration of Metformin Hydrochloride Sustained-Release Tablets and Acarbose Tablets, on this basis, the patients in the observation group were treated with probiotics. Both groups were treated for eight weeks. **Results** The total clinical effective rate of the observation group was 94.12%, which was significantly higher than 80.39% of the control group ($P < 0.05$). The proportion of iNKT cells and interleukin-4 (IL-4)+iNKT in the observation group was significantly higher than that in the control group, the number of bifidobacteria and lactobacillus in the observation group was significantly more than that in the control group, while the proportion of interferon γ (IFN- γ)+iNKT, the levels of fasting blood glucose (FBG), glycosylated hemoglobin (HbA_{1c}), 2-hour postprandial blood glucose (2 hPG), high-sensitivity C-reactive protein (hs-CRP), interleukin-6 (IL-6) and lipopolysaccharide (LPS) in the observation group were significantly lower than those in the control group, and the number of enterococci and coccobacteria in the observation group was significantly fewer than that in the control group ($P < 0.05$). The incidence of adverse reactions in the observation group was similar to that in the control group (11.76% vs. 17.65%, $P > 0.05$). **Conclusion** Probiotics can improve the levels of iNKT cells, reduce the level of blood glucose and inflammatory factors, and improve the imbalance of intestinal flora in patients with T2DM.

Key words: type 2 diabetes mellitus; probiotics; invariant natural killer T cells; inflammatory factors; intestinal flora

高盐、高糖及高脂的摄入等不良生活习惯导致肥胖及糖尿病(DM)等慢性代谢性疾病的发病率不断增加,其中以2型糖尿病(T2DM)最多见^[1-2]。恒定自然杀伤T(iNKT)细胞为特殊免疫细胞亚群,可通过多条代谢

途径参与机体的免疫应答及维持脂肪组织的免疫稳态。iNKT细胞与脂肪组织炎症密切相关,而脂肪组织炎症是DM发病的重要机制^[3-4]。益生菌为有利于宿主的一种非致病性微生物,已被证实可改善DM患者的糖代

*基金项目:国家自然科学基金面上项目[81660149]。

第一作者:冯罡,男,蒙古族,硕士研究生,副主任医师,研究方向为内分泌代谢性疾病的诊疗,(电子信箱)909614340@qq.com。

△通信作者:王晓丽,女,汉族,博士研究生,副主任医师,研究方向为糖尿病的诊疗,(电子信箱)xiaowlyy@163.com。

表 1 两组患者一般资料比较($n = 51$)

Tab. 1 Comparison of the patients' general data between the two groups ($n = 51$)

组别	性别(男/女,例)	年龄($\bar{X} \pm s$,岁)	病程($\bar{X} \pm s$,年)	体质量指数($\bar{X} \pm s$,kg/m ²)	腰围($\bar{X} \pm s$,cm)	收缩压($\bar{X} \pm s$,mmHg)	舒张压($\bar{X} \pm s$,mmHg)
观察组	31/20	54.72 $\pm$ 7.42	4.09 $\pm$ 0.68	25.10 $\pm$ 5.48	87.54 $\pm$ 8.16	136.74 $\pm$ 12.45	75.11 $\pm$ 8.24
对照组	30/21	54.25 $\pm$ 7.50	4.14 $\pm$ 0.50	25.27 $\pm$ 5.19	86.26 $\pm$ 8.12	137.45 $\pm$ 13.17	73.65 $\pm$ 8.37
χ^2/t 值	0.041	0.318	0.423	0.161	0.794	0.280	0.888
P 值	0.084	0.751	0.673	0.873	0.429	0.780	0.377

谢及肠道菌群失调等^[5]。本研究中探讨了益生菌干预对 T2DM 患者的 iNKT 细胞、血糖指标、炎性因子及肠道菌群的影响,从而为防治 T2DM 提供参考。现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料

纳入标准:符合世界卫生组织(WHO)T2DM 诊断和分型标准^[6];无相关治疗或服药史,且近 1 个月内未服用抗生素及微生物制剂。本研究经医院医学伦理委员会批准,患者签署知情同意书。

排除标准:单纯降血糖药不能控制血糖,需皮下注射胰岛素治疗;合并严重并发症;既往有胃肠道手术史及近期有胃肠道或肝胆系统疾病;合并严重心、肝、肾功能不全,及其他内分泌疾病及自身免疫性疾病。

病例选择与分组:本研究为随机对照研究。选取青岛滨海学院附属医院和浙江省立同德医院 2018 年 3 月至 2020 年 12 月收治的 T2DM 患者 102 例,按随机数字表法分为观察组及对照组,各 51 例。两组患者一般资料比较,差异无统计学意义($P > 0.05$),具有可比性。详见表 1。

1.2 方法

两组患者均予基础治疗,包括糖尿病有关的饮食运动等健康指导、他汀类药物调脂等,并予盐酸二甲双胍缓释片(青岛黄海制药有限责任公司,国药准字 H20040154,批号为 2012159,规格为每片 0.5 g),每次 0.5 g,每日 2 次,早晚饭后口服;阿卡波糖片(拜耳医药保健有限公司,国药准字 H19990205,批号为 8J56377,规格为每片 50 mg),起始剂量为每次 1 片、每日 3 次,以后逐渐增加至每次 2 片、每日 3 次,餐前口服。观察组患者加服双歧杆菌三联活菌胶囊(晋城海斯制药有限公司,国药准字 S19993065,批号为 20200906,规格为每粒 0.21 g),每次 3 片,每日 3 次,饭后温开水送服。两组患者均治疗 8 周。

1.3 观察指标与疗效判定标准

外周血 iNKT 细胞比例及细胞因子水平:分别采集患者治疗前后的空腹静脉血各约 3 mL,提取外周血淋巴细胞,加入 CD3 - PerCP 抗体及 V α 24 - J α 18FTTC 抗体后,采用流式细胞仪检测 iNKT 细胞比例。试剂盒购自北京索莱宝生物科技有限公司,按试剂盒说明书操作。

将外周淋巴细胞接种到 96 孔板中,经过培养、刺激、洗涤及重悬后,加入 CD3 - PerCP 抗体及 V α 24 - J α 18FTTC 抗体,染色,在经过孵育、洗涤、固定、重悬后,加入白细胞介素 4 - 抗原提呈红细胞(IL - 4 - APC)抗体及藻红蛋白(IFN - γ - PE)抗体,采用流式细胞仪检测 IL - 4⁺iNKT 及 IFN - γ ⁺iNKT 因子水平。

血糖指标:分别采集患者治疗前后的静脉血各约 3 mL,采用血糖仪检测外周血空腹血糖(FBG)、糖化血红蛋白(HbA_{1c})及餐后 2 h 血糖(2 hPG)水平。

外周血炎性因子:采用酶联免疫吸附(ELISA)法检测血清超敏 C 反应蛋白(hs - CRP)、白细胞介素 6(IL - 6)及脂多糖(LPS)水平,试剂盒均购自北京索莱宝生物科技有限公司,按试剂盒说明书操作。

肠道菌群分布:采集患者治疗前后的中段大便样本。采用定量法检测肠道菌群变化,包括大肠杆菌、球杆菌、双歧杆菌、乳杆菌。从无菌厌氧罐内取出 1 g 粪便样本,溶于灭菌液中,按 1:10(m/V)稀释,反复多次稀释直至为原浓度的 10⁻⁸,将大肠杆菌、球杆菌分别置需氧培养基中,37 $^{\circ}$ C 培养 24 h,双歧杆菌、乳杆菌分别置厌氧培养基中,37 $^{\circ}$ C 培养 48 h。计算各培养基中每 1 g 大便中的目标菌落数(平均菌落数 $\times$ 稀释倍数 $\times$ 500)。

疗效判定^[7]:显效,血糖指标水平达标或降幅 $\geq 90\%$;有效,血糖指标水平降幅 50% $\sim$ $< 90\%$;无效,血糖指标水平降幅 $< 50\%$ 、维持不变甚至有增加。总有效 = 显效 + 有效。

1.4 统计学处理

采用 SPSS 20.0 统计学软件分析。计量资料首先采用 Kolmogorov - Smirnov 检验进行正态性分析,符合正态分布的以 $\bar{X} \pm s$ 表示,组间比较行独立样本 t 检验,组内比较行配对样本 t 检验,不符合正态分布的则采用非参数检验;计数资料比较行 χ^2 检验;等级资料组间比较行秩和检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

结果见表 2 至表 7。

3 讨论

目前,临床治疗 T2DM 以口服降糖药物为主,如盐酸二甲双胍和阿卡波糖等,疗效已得到证实,但同时也有不良反应,故临床仍需寻求新的增效减毒治疗方案^[8]。

表 2 两组患者外周血中 iNKT 细胞比例及细胞因子水平比较($\bar{X} \pm s, \%, n = 51$)

组别	iNKT 细胞比例		<i>t</i> / <i>P</i> 值	IL - 4 ⁺ iNKT 细胞比例		<i>t</i> / <i>P</i> 值	IFN - γ ⁺ iNKT 细胞比例		<i>t</i> / <i>P</i> 值
	干预前	干预后		干预前	干预后		干预前	干预后	
观察组	0.35 $\pm$ 0.18	0.61 $\pm$ 0.17	7.499 / 0.000	18.85 $\pm$ 7.43	26.14 $\pm$ 7.96	4.781 / 0.000	52.19 $\pm$ 9.59	39.85 $\pm$ 9.75	6.444 / 0.000
对照组	0.34 $\pm$ 0.13	0.49 $\pm$ 0.18	4.825 / 0.000	18.61 $\pm$ 7.29	22.69 $\pm$ 7.50	2.786 / 0.000	53.01 $\pm$ 9.82	44.39 $\pm$ 8.25	4.800 / 0.000
<i>t</i> 值	0.322	3.461		0.165	2.253		0.427	2.539	
<i>P</i> 值	0.748	0.001		0.870	0.026		0.671	0.013	

表 3 两组患者外周血糖指标水平比较($\bar{X} \pm s, n = 51$)

组别	FBG (mmol / L)		<i>t</i> / <i>P</i> 值	2 hPG (mmol / L)		<i>t</i> / <i>P</i> 值	HbA _{1c} (%)		<i>t</i> / <i>P</i> 值
	干预前	干预后		干预前	干预后		干预前	干预后	
观察组	9.55 $\pm$ 1.55	6.51 $\pm$ 1.22	11.006 / 0.000	12.81 $\pm$ 1.56	8.51 $\pm$ 0.83	17.373 / 0.000	8.74 $\pm$ 0.63	6.56 $\pm$ 0.80	15.289 / 0.000
对照组	9.57 $\pm$ 1.52	7.67 $\pm$ 1.24	6.917 / 0.000	12.79 $\pm$ 1.19	10.05 $\pm$ 0.86	11.065 / 0.000	8.70 $\pm$ 0.76	7.67 $\pm$ 1.24	5.058 / 0.000
<i>t</i> 值	0.060	4.762		0.073	9.202		0.289	5.372	
<i>P</i> 值	0.948	0.000		0.942	0.026		0.773	0.000	

表 4 两组患者外周血炎症因子水平比较($\bar{X} \pm s, n = 51$)

组别	hs - CRP (mg / L)		<i>t</i> / <i>P</i> 值	IL - 6 (ng / L)		<i>t</i> / <i>P</i> 值	LPS (pg / mL)		<i>t</i> / <i>P</i> 值
	干预前	干预后		干预前	干预后		干预前	干预后	
观察组	7.56 $\pm$ 1.21	4.75 $\pm$ 0.99	12.836 / 0.000	87.96 $\pm$ 11.73	59.82 $\pm$ 9.29	13.430 / 0.000	198.17 $\pm$ 39.70	159.84 $\pm$ 19.68	6.178 / 0.000
对照组	7.59 $\pm$ 1.20	5.81 $\pm$ 0.98	8.205 / 0.000	88.40 $\pm$ 11.66	68.97 $\pm$ 9.73	9.137 / 0.000	200.03 $\pm$ 36.01	168.97 $\pm$ 20.44	5.058 / 0.000
<i>t</i> 值	0.126	5.434		0.190	4.857		0.248	2.298	
<i>P</i> 值	0.900	0.000		0.850	0.000		0.805	0.024	

表 5 两组患者肠道菌群水平比较 [$\bar{X} \pm s, \lg (N / g), n = 51$]

组别	肠 球 菌		球 杆 菌		双 歧 杆 菌		乳 杆 菌	
	干预前	干预后	干预前	干预后	干预前	干预后	干预前	干预后
观察组	10.95 $\pm$ 0.94	7.86 $\pm$ 0.51 [*]	8.53 $\pm$ 1.04	6.74 $\pm$ 0.84 [*]	7.22 $\pm$ 0.60	9.32 $\pm$ 0.46 [*]	6.55 $\pm$ 0.45	8.31 $\pm$ 0.48 [*]
对照组	10.91 $\pm$ 0.95	8.79 $\pm$ 0.54 [*]	8.57 $\pm$ 1.05	7.66 $\pm$ 0.88 [*]	7.18 $\pm$ 0.67	8.45 $\pm$ 0.45 [*]	6.53 $\pm$ 0.44	7.57 $\pm$ 0.45 [*]
<i>t</i> 值	0.214	8.942	0.193	5.401	0.318	9.544	0.227	8.032
<i>P</i> 值	0.831	0.000	0.847	0.000	0.751	0.000	0.821	0.000

注:与本组治疗前比较,^{*}*P* < 0.05。
Note:Compared with those before treatment,^{*}*P* < 0.05.

表 6 两组患者临床疗效比较[例(%), *n* = 51]

组别	Tab. 6 Comparison of clinical efficacy between the two groups [case(%), <i>n</i> = 51]			
	显效	有效	无效	总有效
观察组	33(64.71)	15(29.41)	3(5.88)	48(94.12)
对照组	25(49.02)	16(31.37)	10(19.61)	41(80.39)
χ^2 值		4.905		4.320
<i>P</i> 值		0.086		0.038

iNKT 细胞属特殊的 T 淋巴细胞亚群,其可通过识别由 CD1d 分子提呈的脂质抗原,进而被激活,活化的 iNKT 细胞可分泌 IL - 4 和 IFN - γ 等多种细胞因子,进一步发挥免疫调节作用^[9]。研究显示,肥胖患者外周血

表 7 两组患者不良反应发生情况比较[例(%), *n* = 51]

组别	Tab. 7 Comparison of incidence of adverse reactions between the two groups[case(%), <i>n</i> = 51]				
	腹泻	腹胀	低血糖	排气次数增多	合计
观察组	2(3.92)	1(1.96)	1(1.96)	2(3.92)	6(11.76)
对照组	3(5.88)	2(3.92)	1(1.96)	3(5.88)	9(17.65)
χ^2 值					0.636
<i>P</i> 值					0.425

中 iNKT 细胞比例降低,其分泌的抗炎因子水平也随之下降^[10]。LYNCH 等^[11]的研究表明,缺乏 iNKT 细胞的模型小鼠通过高脂喂养后出现促炎因子水平升高而抑炎因子水平降低、体质量增加、FBG 显著升高等糖耐量受

损现象,直接输注 iNKT 细胞后,可改善模型小鼠 iNKT 细胞增殖活跃、体质量减轻等情况,提示 iNKT 细胞与 T2DM 的发生、发展密切相关。

T2DM 也是一种由细胞因子介导的慢性炎症性疾病, IL-6 和 hs-CRP 等炎症因子水平的升高可能是 T2DM 进展的危险因素^[12]。IL-6 是由活化的 T 细胞分泌的促炎细胞因子,其可促进 B 细胞活化,产生大量 IgG 抗体,进而使杀伤性 T 细胞的过度活化,引起胰岛 B 细胞死亡,导致胰岛素分泌不足。hs-CRP 是当机体受到刺激或损伤时由肝脏合成的一种急性期蛋白,是机体炎症反应的灵敏性指标。当各种刺激导致细胞因子分泌增多时,肝脏可促进合成 hs-CRP,从而抑制胰岛素受体活性、加重胰岛素抵抗;而胰岛素抵抗会导致胰岛素敏感性下降,减弱对肝脏合成 hs-CRP 的抑制作用,进一步促进其分泌增加。研究已证实,DM 患者外周血中 IL-6 和 hs-CRP 水平显著升高^[13]。

LPS 是革兰阴性细菌代谢过程中的主要产物,被认为是慢性炎症的关键刺激因子^[14]。T2DM 患者的 LPS 水平显著高于健康人群,经治疗后显著降低^[15-16]。

肠道菌群紊乱可引发组织的慢性炎症及能量代谢紊乱等,进而导致机体胰岛素抵抗等^[17],其与 T2DM 发生、发展密切相关。T2DM 患者肠道中存在有害菌群增多状况,通过益生菌干预可显著增加肠道有益菌含量,改善肠道菌群失调状态^[18-19]。郑雪萍等^[20]的研究显示,益生菌联合常规降糖治疗可显著改善 DM 患者的糖代谢指标,并提高原有治疗方案的临床疗效。SUN 等^[21]的研究表明,使用益生菌联合降血糖药治疗后患者的炎症因子水平显著降低,说明益生菌具有调节免疫及减轻炎症反应作用。本研究结果显示,益生菌干预后患者的临床疗效、iNKT 细胞比例、IL-4⁺iNKT 比例显著升高,双歧杆菌及乳杆菌数量显著增加,其 IFN- γ ⁺iNKT 比例和 FBG, HbA_{1c}, 2 hPG, hs-CRP, IL-6, LPS 水平均显著降低,肠球菌和球杆菌数量均显著减少,说明益生菌干预可改善 T2DM 患者的免疫内环境、糖代谢、肠道菌群失调状况,并减轻机体的炎症反应。此外,两组患者的不良反应发生率相当,表明益生菌干预不会增加药品不良反应。

综上所述,益生菌干预可改善 T2DM 患者的 iNKT 细胞水平、降低血糖和炎症因子水平,并改善肠道菌群失调状态。

参考文献

[1] CHOI JB, YOO JM, LEE YJ, et al. Effect of the sodium-glucose cotransporter 2 inhibitor, dapagliflozin, on genitourinary infection in an animal model of type 2 diabetes[J]. *Int Neurourol J*, 2020, 24(1): 21-28.

[2] NAGENDRA HR, NAGARATHNA R, RAJESH SK, et al. Nityanrita Madhumeha Bharata 2017, Methodology for a Nationwide Diabetes Prevalence Estimate: Part 1 [J]. *Int J Yoga*, 2019, 12(3): 179-192.

[3] ZHANG H, XUE R, ZHU S, et al. M2-specific reduction of CD1d switches NKT cell-mediated immune responses and triggers metaflammation in adipose tissue [J]. *Cell Mol Immunol*, 2018, 15(5): 506-517.

[4] 陈冬志, 赵会娟, 尹晓琳, 等. NOD/Ltj 小鼠 I 型糖尿病不同发病阶段细胞免疫状态研究 [J]. *中国免疫学杂志*, 2019, 35(5): 526-533.

[5] 陈 晔, 王彦杰, 尤利军, 等. 益生菌 Probio-Fit 联合二甲双胍对 II 型糖尿病患者疗效及肠道菌群结构的影响 [J]. *中国食品学报*, 2019, 19(4): 16-26.

[6] World Health Organization. Definition diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: Diagnosis and classification of diabetes mellitus [EB/OL]. (1999)[2021-01-03]. <http://wenku.baidu.com/view/3cef4a8002d276a200292ed8.html>.

[7] 蔡 畅. 拜糖平与二甲双胍用于 2 型糖尿病治疗的效果及不良反应对比 [J]. *中国现代药物应用*, 2019, 13(19): 98-100.

[8] 玉 庆. 阿卡波糖联合二甲双胍治疗 2 型糖尿病的疗效探讨 [J]. *糖尿病新世界*, 2020, 23(7): 73-74.

[9] CROSBY CM, KRONENBERG M. Tissue-specific functions of invariant natural killer T cells [J]. *Nat Rev Immunol*, 2018, 18(9): 559-574.

[10] MARICIC I, MARRERO I, EGUCHI A, et al. Differential Activation of Hepatic Invariant NKT Cell Subsets Plays a Key Role in Progression of Nonalcoholic [J]. *Steatohepatitis Immunol*, 2018, 201(10): 3017-3035.

[11] LYNCH L, HOGAN AE, DUQUETTE D, et al. iNKT cells induce FGF21 for thermogenesis and are required for maximal weight loss in GLPI therapy [J]. *Cell Metab*, 2016, 24(3): 510-519.

[12] 王海洋. 阿卡波糖对 2 型糖尿病患者对其慢性炎症相关因子水平的影响 [J]. *慢性病学杂志*, 2018, 11(8): 1588-1590.

[13] 丁 彦, 常红云. 糖尿病肾病患者血清 hs-CRP、IL-6、MCP-1 及 Angpt14 水平变化特点及临床意义 [J]. *四川医学*, 2019, 40(11): 1150-1154.

[14] 林玉玲, 刘 琳, 籍胤玺, 等. 2 型糖尿病合并牙周炎患者龈沟液中炎症因子、瘦素和脂多糖水平的变化及其临床意义 [J]. *中国糖尿病杂志*, 2016, 24(9): 815-819.

[15] 刘海霞, 孙李永隽, 刘 奔, 等. 阿卡波糖对 2 型糖尿病患者慢性炎症相关因子水平的影响 [J]. *中华内分泌代谢杂志*, 2011, 27(3): 193-198.

[16] 宋丹丹, 刘 煜. 肠道菌群变化在 2 型糖尿病诊疗中的价值 [J]. *中国实验诊断学*, 2017, 21(1): 184-187.

[17] SALGAÇO MK, OLIVEIRA LGS, COSTA GN, et al. Relationship between gut microbiota, probiotics, and type 2 diabetes mellitus [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2019, 103(24): 9229-