doi:10.11659/jjssx.05E024072

·基础研究·

腺苷A3受体促进胶质瘤上皮间质转化及其对预后的影响

程 功[1,2],童 祥[3],徐 梦[1],蔡 强[2] (1.洪湖市人民医院重症医学科,湖北 洪湖 433200;2.武汉大学人民医院神经外科,湖北 武汉 430060;3.洪湖市人民医院神经外科,湖北 洪湖 433200)

[摘 要] **目的** 探究腺苷A3受体(ADORA3)在人脑胶质瘤中的表达及其对预后和上皮间质转化的影响。**方法** 从TCGA、CGGA、Rembrandt、Gravendeel和Gill数据库中获取ADORA3的mRNA表达数据与对应的临床信息,分析ADORA3的表达对胶质瘤患者预后及上皮间质转化进程的影响。收集武汉大学人民医院神经外科2023年7月至2024年4月手术切除的胶质瘤样本35例及重型颅脑损伤减压术中切取的非肿瘤脑组织7例,采用免疫组化染色检测ADORA3的表达。于多形性胶质母细胞瘤(GBM)细胞U87和U251中分别转染NcRNA、SiRNA,作为对照组和敲低组,Transwell和免疫印迹法分析ADORA3对细胞侵袭能力和上皮间质转化相关蛋白的影响。**结果** 生物信息分析及免疫组化染色结果显示,ADORA3在人脑胶质瘤组织中的表达水平明显高于非肿瘤脑组织($P<0.05$),且ADORA3表达与胶质瘤WHO分级有关($P<0.05$)。在TCGA、CGGA、Rembrandt和Gravendeel数据库中进行*Kaplan-Meier*生存曲线分析,结果显示,ADORA3高表达的患者总生存率明显低于低表达患者($P<0.001$);*Cox*回归分析显示,ADORA3高表达是胶质瘤患者预后不良的独立危险因素($P<0.05$);ADORA3在GBM患者的间充质型中的表达水平明显高于古典型和前神经型;此外,ADOR3与上皮间质转化进程相关的标志物Vimentin、SNAI1、SNAI2、TWIST1、TWIST2、MMP2、CD44和FN1明显相关。体外敲低ADORA3后细胞侵袭能力降低,MMP2、Vimentin和SNAI1蛋白表达下调,E-cadherin表达增加,差异均有统计学意义($P<0.05$)。**结论** ADORA3在胶质瘤中高表达,可促进患者上皮间质转化进程,且是预后不良的独立危险因素。

[关键词] ADORA3;胶质瘤;预后;上皮间质转化

[中图分类号] R739.4 [文献标志码] A [收稿日期] 2024-05-15

Adenosine A3 receptor promotes epithelial-mesenchymal transition in glioma and its effect on prognosis

CHENG Gong[1,2], TONG Xiang[3], XU Meng[1], CAI Qiang[2] (1. Department of Critical Care Medicine, Honghu People's Hospital, Honghu Hubei 433200, China; 2. Department of Neurosurgery, Renmin Hospital of Wuhan University, Wuhan Hubei 430060, China; 3. Department of Neurosurgery, Honghu People's Hospital, Honghu Hubei 433200, China)

Abstract: Objective To investigate the expression of adenosine A3 receptor (ADORA3) in human glioma and its effects on prognosis and epithelial-mesenchymal transition. **Methods** The mRNA expression data and corresponding clinical information of ADORA3 were obtained from TCGA, CGGA, Rembrandt, Gravendeel and Gill databases, and the effects of ADORA3 expression on the prognosis of glioma patients and the process of epithelial-mesenchymal transition were analyzed. The surgically resected glioma samples of 35 cases, along with non-tumor brain tissues of 7 cases obtained from decompression surgery for severe craniocerebral injury were collected in the Department of Neurosurgery at Renmin Hospital of Wuhan University from July 2023 to April 2024, and the ADORA3 expression was detected by immunohistochemical staining. Glioblastoma multiforme (GBM) cells of U87 and U251 were transfected with NcRNA and SiRNA, respectively, as the control group and the knockdown group, and the effects of ADORA3 on cell invasion ability and epithelial-mesenchymal transition related proteins were analyzed by Transwell and Western blot. **Results** Bioinformatics analysis and immunohistochemical staining showed that the expression level of ADORA3 in human glioma tissues was significantly higher than that in non-tumor brain tissues ($P<0.05$), and the expression of ADORA3 was associated with glioma WHO grading ($P<0.05$). *Kaplan-Meier* survival curve analysis in TCGA, CGGA, Rembrandt and Gravendeel databases showed that the overall survival rate of patients with high ADORA3 expression was significantly lower than that of patients with low ADORA3 expression ($P<0.001$); and *Cox* regression analysis showed that high expression of ADORA3 was an independent risk factor for poor prognosis in patients with glioma ($P<0.05$); the expression level of ADORA3 in the mesenchymal type of GBM patients was significantly higher than that of the classical type and the proneural type; furthermore, ADORA3 showed significant correlations with epithelial-mesenchymal transition related markers of Vimentin, SNAI1, SNAI2, TWIST1, TWIST2, MMP2, CD44, and FN1. The knockdown of ADORA3 in vitro reduced the cell invasive ability, decreased the expression levels of MMP2,

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81971158)

[通信作者] 蔡 强,E-mail:cqno@sina.com

Vimentin, and SNAI1 proteins, and increased the expression of E-cadherin, with statistically significant differences (P<0.05). **Conclusion** ADORA3 is highly expressed in glioma, which can promote the process of epithelial-mesenchymal transition in patients, and serve as an independent risk factor for poor prognosis.

Keywords: ADORA3; glioma; prognosis; epithelial-mesenchymal transition

神经胶质瘤是中枢神经系统最常见的原发性颅内恶性肿瘤。根据WHO中枢神经系统肿瘤分类，胶质瘤被分为Ⅰ~Ⅳ级。其中多形性胶质母细胞瘤（glioblastoma multiforme，GBM）WHO Ⅳ级约占胶质瘤的50%，恶性程度高，且易侵袭、转移和复发[1-2]。目前，胶质瘤的治疗方式主要是最大安全范围手术切除，辅以替莫唑胺同步放化疗。然而，胶质瘤患者的预后依然不佳。GBM患者的生存期为12~14个月，5年生存率不足5%[3-4]。随着近年来高通量测序和生物信息学的飞速发展，许多与胶质瘤发生和进展相关的生物标志物被发现。因此，2016年WHO新发布的中枢神经系统肿瘤分类指南将组织学分级和分子分类系统综合运用以实现更精准的胶质瘤分类。异柠檬酸脱氢酶1/2、O-6-甲基鸟嘌呤-DNA甲基转移酶等多个分子标志物被用于评估胶质瘤预后和替莫唑胺化疗敏感性[5-6]。2021年WHO更新了中枢神经系统肿瘤分类标准，将分子标志物作为核心诊断依据，新增并明确定义了超过40种肿瘤类型及亚型。但将分子生物标志物配合靶向治疗进行精准个体化管理尚未实现。因此，需要进一步研究以确定胶质瘤发生、进展和复发的精确分子机制，以提供有价值的预后生物标志物和治疗靶点[7-8]。

腺苷A3受体（adenosine A3 receptor，ADORA3）是腺苷受体家族的一员，腺苷受体可在不同组织中表达，具有不同的生理和病理作用。ADORA3与G蛋白偶联受体的抑制性亚基结合，可抑制腺苷酸环化酶将ATP转化为cAMP[9]。然而，ADORA3在人脑胶质瘤中的表达及其潜在的生物学作用尚未明确。本研究通过生物信息分析和实验验证ADORA3在胶质瘤发生和发展中的生物学功能，以期了解胶质瘤发生的分子机制，为其早期诊断和治疗提供靶点。

1 材料与方法

1.1 数据获取

检索GlioVis在线网站[10]，下载TCGA-GBM、TCGA-GBMLGG、CGGA、Rembrandt、Gravendeel和Gill数据集中ADORA3的mRNA数据及对应的临床资料，排除预后信息不全的样本。

1.2 组织标本来源

收集武汉大学人民医院神经外科2023年7月至2024年4月手术切除的35例胶质瘤样本及7例重型颅脑损伤减压术中切取的非肿瘤脑组织。标本切除后置于液氮中保存，使用石蜡包埋。所有的样本均征得患者同意后获得，本研究经武汉大学人民医院临床研究医学伦理学委员会批准（批准号：WDRY2023-K125）。

1.3 试剂与抗体

ADORA3抗体购自英国Abcam公司，E-cadherin、MMP2、SNAI1、Vimentin、GAPDH和二抗均购自武汉三鹰生物有限公司。DMEM培养基、OTPI培养基购自杭州吉诺生物有限公司。

1.4 免疫组化染色

石蜡包埋后切片，依次经过二甲苯及100%、95%、75%乙醇脱蜡及脱水，每次5 min。PBS清洗5 min后用枸橼酸柠檬酸钠溶液进行抗原修复，使用3%过氧化氢溶液去除内源性的过氧化物酶。使用山羊血清封闭30 min后加入适量的ADORA3抗体（1∶200），4 ℃孵育过夜；次日添加适量的HRP二抗孵育1 h，DAB和苏木素进行染色，75%、95%、100%乙醇和二甲苯依次脱水，中性树脂封片，显微镜下拍照。ADORA3的表达强度通过阳性细胞比例进行评分，<10%为0分，10%~25%为1分，26%~50%为2分，51%~75%为3分，>75%为4分，其中0~2分为低表达，3~4分为高表达。

1.5 细胞转染

GBM细胞U87和U251用含10%胎牛血清的DMEM高糖培养基培养，然后种植到6孔板中，待细胞生长布满皿底约60%时，将2 μg NcRNA、SiRNA质粒和5 μL脂质体转染试剂（上海翌圣）加入200 μL OPTI培养基中轻轻混匀，作为对照组和敲低组，15 min后移至6孔板，置于培养箱中培养6 h后换液，培养48 h后进行后续实验。

1.6 细胞侵袭实验

对照组和敲低组细胞用胰酶消化，计数后将30 000个细胞移至200 μL无血清培养基中混匀，然后置于预先添加基质胶的Transwell小室中，在24孔板中加入600 μL含10%胎牛血清的DMEM培养基，培养

24 h后4%多聚甲醛固定、结晶紫染色,风干后拍照,计算侵袭细胞数。

1.7 免疫印迹法

收集对照组和敲低组细胞,根据目的蛋白分子量配制适宜浓度的PAGE-SDS凝胶,将蛋白装载到凝胶后分别进行电泳、转膜、封闭。PBST洗膜3次后根据目的蛋白分子量进行裁剪,然后于4 ℃与E-cadherin(1∶1 000)、MMP2(1∶1 000)、SNAI1(1∶1 000)、Vimentin(1∶1 000)、ADORA3(1∶1 000)和GAPDH(1∶100 000)一抗孵育过夜,次日PBST清洗条带3次,室温下使用HRP标记的兔/鼠二抗(1∶5 000)孵育1 h后使用ECL发光液显影。

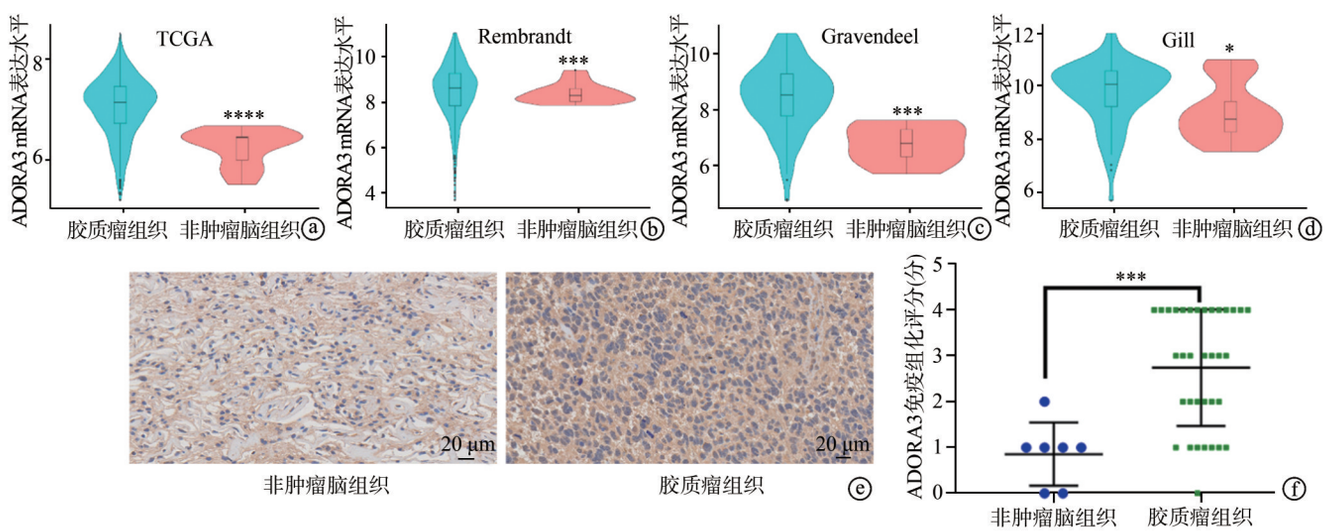
1.8 统计学分析

采用SPSS 23.0和GraphPad Prism 8.01软件分析数据。定量数据以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,2组间比较采用t检验,多组间比较采用单因素方差分析,进一步比较采用*Tukey*检验。采用受试者工作特征(*receiver operating characteristic*,*ROC*)曲线检验ADORA3预测GBM间充质型的准确性;*Spearman*相关系数分析ADORA3表达与上皮间质转化相关标志物的相关性;多因素*Cox*比例风险回归模型及生存曲线分析预后的影响因素。P<0.05为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 ADORA3在人脑胶质瘤组织中高表达

TCGA、Rembrandt、Gravendeel和Gill数据库分析显示,胶质瘤中ADORA3 mRNA水平显著高于非肿瘤脑组织(P<0.05),见图1a~d。免疫组化染色结果显示,ADORA3在胶质瘤组织中的表达水平明显高于非肿瘤脑组织(P<0.001),见图1e~f。ADORA3表达与年龄、性别、肿瘤位置、KPS评分和IDH状态无关(P>0.05),但与胶质瘤WHO分级有关(P<0.05),见表1。



a~d:TCGA、Rembrandt、Gravendeel和Gill数据库中调查ADORA3 mRNA在人脑胶质瘤和非肿瘤脑组织中的表达;e~f:免疫组化评估ADORA3在人脑胶质瘤和非肿瘤脑组织中的表达 *:与胶质瘤组织相比,P<0.05;***:与胶质瘤组织相比,P<0.001;****:与胶质瘤组织相比,P<0.000 1

图1 ADORA3在人脑胶质瘤中高表达

表1 胶质瘤组织中ADORA3表达与临床特征的关系[例(%)]

临床特征		n	ADORA3		P
			低表达(n=14)	高表达(n=21)	
年龄	<60岁	21	9(25.7)	12(34.3)	0.74
	≥60岁	14	5(14.3)	9(25.7)	
性别	女	17	7(20.0)	10(28.6)	0.99
	男	18	7(20.0)	11(31.4)	
肿瘤位置	幕上	30	12(34.3)	18(51.4)	0.99
	幕下	5	2(5.7)	3(8.6)	
KPS评分	≥80分	24	8(22.9)	16(45.7)	0.28
	<80分	11	6(17.1)	5(14.3)	
WHO分级	Ⅱ~Ⅲ级	12	8(22.9)	4(11.4)	0.04
	Ⅳ级	23	6(17.1)	17(48.6)	
IDH状态	突变型	18	10(28.6)	8(22.9)	0.09
	野生型	17	4(11.4)	13(37.1)	0.11

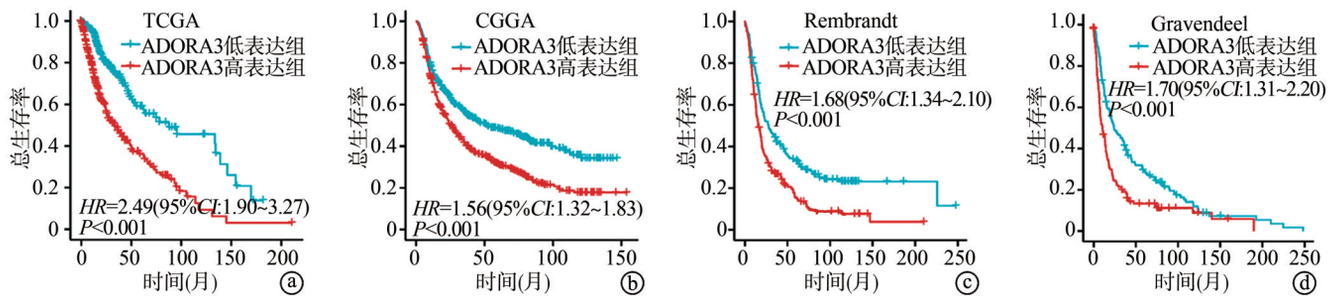
2.2 人脑胶质瘤中ADORA3表达与预后的关系

利用TCGA、CGGA、Rembrandt和Gravendeel数据库对ADORA3影响胶质瘤患者预后的作用进行评估,结果显示,ADOR3高表达胶质瘤患者总生存率明显低于低表达组(P<0.001),见图2。在TCGA和CGGA数据库中进行*Cox*回归分析,结果显示,WHO Ⅳ级、IDH野生型和年龄增长是胶质瘤患者预后不良的独立危险因素,ADORA3表达升高与生存风险显著相关,见表2~3。

2.3 ADORA3与GBM上皮间质转化的相关性

通过TCGA、CGGA、Rembrandt和Gravendeel数据

库分析ADORA3在GBM分子亚型中的表达，结果显示，ADORA3在间充质型中的表达水平明显高于古典型和前神经型（$P<0.05$），见图3a~d。*ROC*曲线分析显示，在TCGA、CGGA、Rembrandt和Gravendeel数据库中ADORA3预测间充质型的*AUC*分别为0.701、0.625、0.814和0.752（图3e~h）。在TCGA和CGGA数据库中进行*Spearman*分析，结果显示，ADORA3表达与Vimentin、SNAI1、SNAI2、TWIST1、TWIST2、MMP2、CD44和FN1表达呈明显正相关（$P<0.01$），见图3i~j。这些结果提示，ADORA3可能参与促进GBM的上皮间质转化。



a~d：TCGA、CGGA、Rembrandt和Gravendeel数据库中*Kaplan-Meier*生存分析

图2 ADORA3对胶质瘤患者预后的影响

表2 基于TCGA数据库对588例胶质瘤患者生存预后的*Cox*比例风险回归模型分析

危险因素		*n*	单因素		多因素	
			HR(95%*CI*)	*P*	*HR*(95%*CI*)	*P*
ADORA3		588	1.462(1.305~1.637)	<0.001	1.143(1.021~1.280)	0.020
WHO分级	Ⅱ~Ⅲ级	449				
	Ⅳ级	139	9.393(6.989~12.626)	<0.001	1.871(1.264~2.768)	0.002
IDH状态	突变型	373				
	野生型	215	10.861(7.947~14.844)	<0.001	4.628(3.070~6.977)	<0.001
年龄		588	1.070(1.059~1.081)	<0.001	1.034(1.021~1.047)	<0.001

表3 基于CCGA数据库对777例胶质瘤患者生存预后的*Cox*比例风险回归模型分析

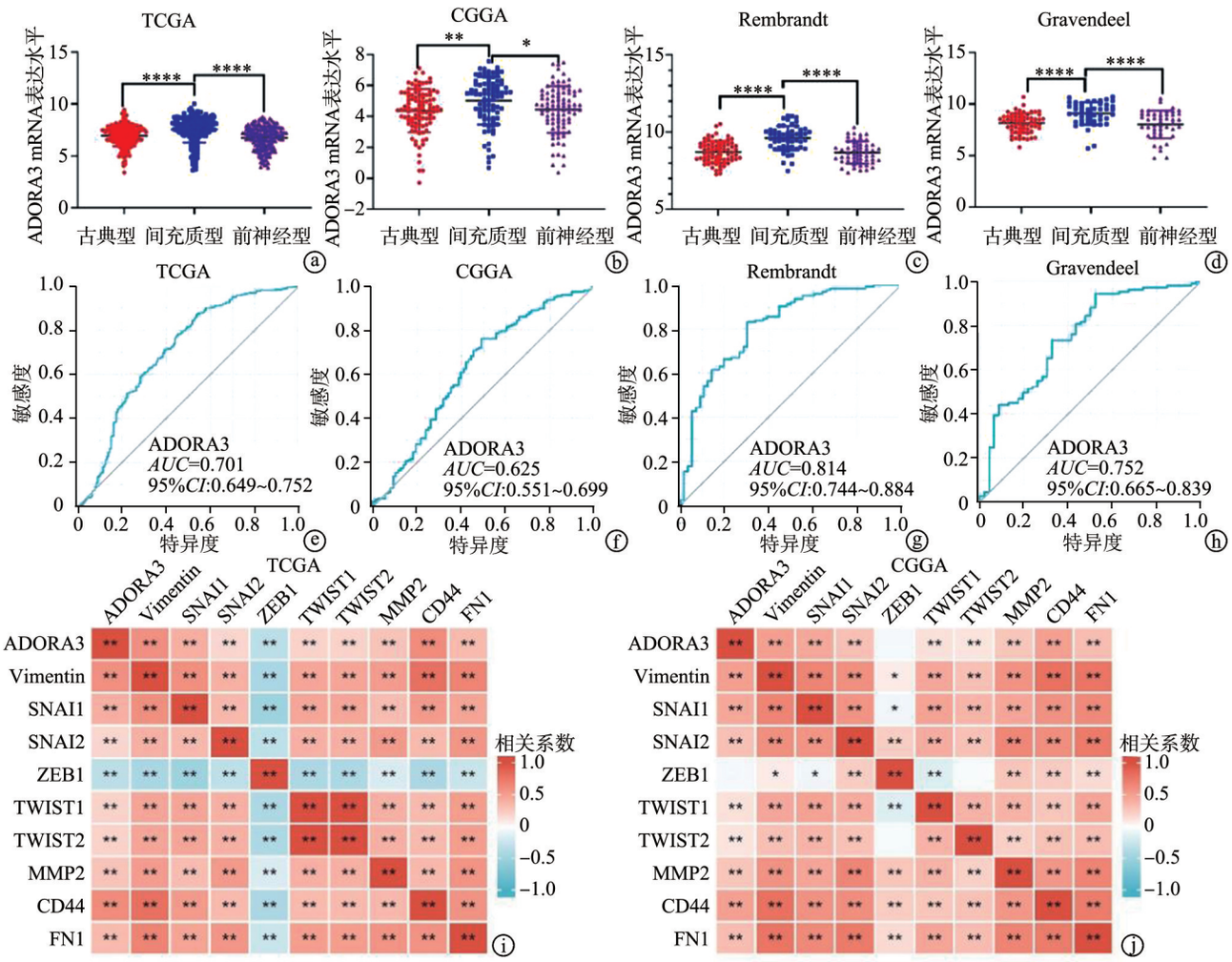
危险因素		*n*	单因素		多因素	
			HR(95%*CI*)	*P*	*HR*(95%*CI*)	*P*
ADORA3		777	1.283(1.189~1.386)	<0.001	1.022(1.001~1.108)	0.010
WHO分级	Ⅱ~Ⅲ级	474				
	Ⅳ级	303	4.444(3.684~5.361)	<0.001	2.832(2.262~3.546)	<0.001
IDH状态	突变型	427				
	野生型	350	3.072(2.558~3.689)	<0.001	1.379(1.109~1.715)	0.004
1p19q状态	联合缺失	164				
	未缺失	613	4.332(3.225~5.819)	<0.001	2.678(1.926~3.723)	<0.001
年龄		777	1.028(1.020~1.036)	<0.001	1.009(1.001~1.016)	0.020

2.4 ADORA3在GBM细胞中生物学功能的验证

Transwell实验显示，敲低ADORA3后U87和U251细胞的侵袭能力减弱（$P<0.05$），见图4a~b。免疫印迹法结果显示，敲低ADORA3后E-cadherin蛋白表达增加（$P<0.05$），MMP2、SNAI1、Vimentin蛋白表达降低（$P<0.05$），见图4c~d。上述结果进一步证实，敲低ADORA3抑制了GBM细胞的上皮间质转化。

3 讨论

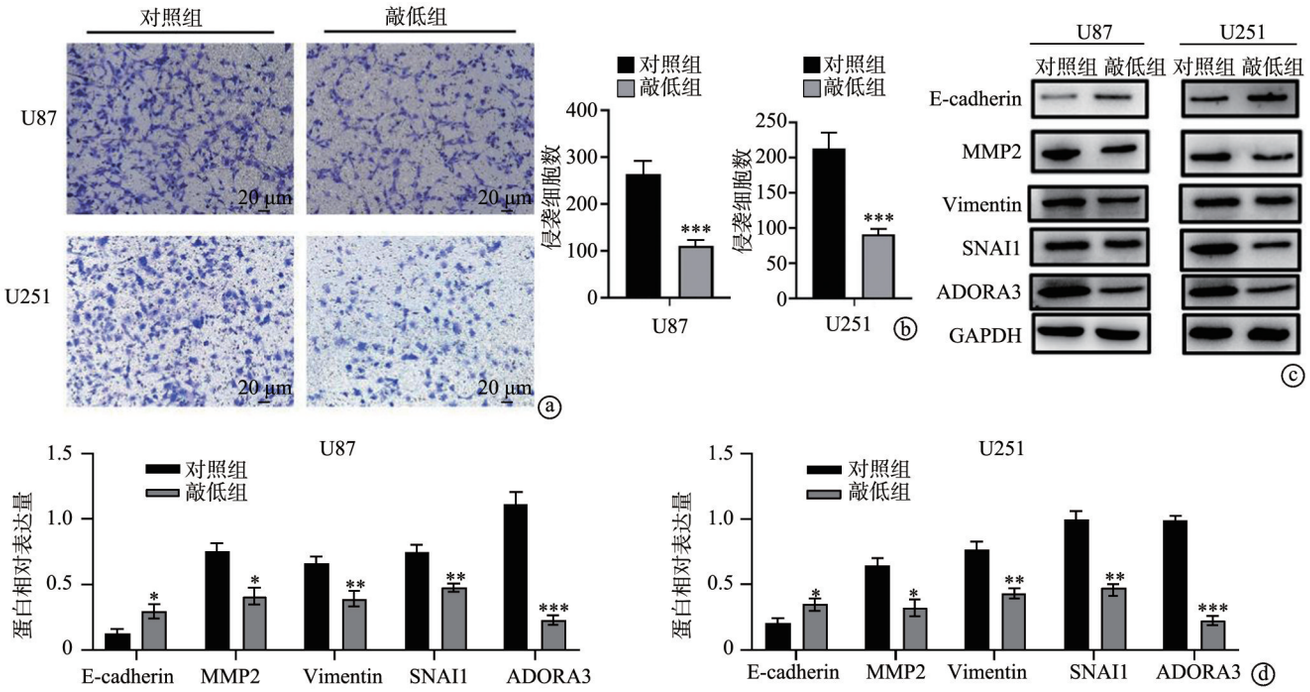
ADORA基因定位于人染色体1p13.3，该基因表达广泛，在脑组织和一些内分泌组织中含量最高。ADORA3参与一系列病理过程，包括心血管、神经和肿瘤相关疾病的发生。腺苷是一种内源性和心脏保护性核苷，参与调节许多生理过程。ADORA3可以保护心肌细胞免受缺血引起的损伤，并通过维持细胞内Ca^{2+}平衡避免其收缩功能障碍和能量消耗损伤[11]。此外，细胞外的腺苷在缺氧条件下激活ADORA3，促进GBM干细胞的侵袭和迁移[12]。ADORA3是一种药物靶标，目前已开发出了一系列针对ADORA3的拮抗剂或激动剂，其在哮喘、慢性阻塞性肺病、青光眼和肝癌等疾病的治疗中展现出潜在的应用价值[13]。因此，探究ADORA3在胶质瘤中的表达及其在疾病发生发展中的作用十分重要。本研究首次发现ADORA3在胶质瘤中高表达，且高表达的ADORA3预示患者预后不良，这将有助于胶质瘤患者的早期诊断及预后评估。



a~d:TCGA、CGGA、Rembrandt和Gravendeel数据库中不同GBM亚型中ADORA3的表达;e~h:*ROC*曲线验证ADORA3预测间充质型的准确性;i~j:*Spearman*法分析TCGA和CGGA数据库中ADORA3与间充质相关基因表达的相关性 *:$P<0.05$;**:$P<0.01$;****:$P<0.000\ 1$

图3 ADORA3与GBM上皮间质转化的相关性

上皮间质转化是上皮细胞获得间充质干细胞表型的过程,与肿瘤进展密切相关。上皮间质转化过程主要由一组核心上皮间质转化激活转录因子(包括SNAI1、SNAI2、TWIST1和TWIST2)执行,可抑制E-cadherin的表达,同时间接激活与间充质表型相关的基因(如Vimentin、FN1等)。上皮间质转化可促进肿瘤细胞生长、侵袭、转移,增加抵抗凋亡的能力和诱导耐药性产生[14-15]。上皮间质转化是驱动胶质瘤细胞迁移的主要机制之一,上皮胶质瘤细胞失去其细胞极性,经历细胞骨架重组后转分化为间质细胞,获得迁移表型[16]。GBM根据分子特征和表型差异分为古典型、间充质型和前神经型。研究显示,间充质型GBM与上皮间质转化相关[17],该亚型恶性程度最高,患者预后最差[18]。本研究中,ADORA3在GBM间充质型中高表达,其表达与多个间质相关基因显著相关,提示胶质瘤中ADORA3高表达可能与患者不良预后和上皮间质转化相关。为了验证猜想,我们在公共数据库中分析了ADORA3表达水平与胶质瘤患者预后的关系,结果显示,ADORA3高表达与胶质瘤患者的不良预后密切相关;体外实验证实,敲低ADORA3表达可影响GBM细胞的上皮间质转化;Transwell实验表明,敲低ADORA3减弱了GBM细胞的侵袭能力;免疫印迹检测显示,敲低ADORA3表达后,GBM细胞上皮间质转化相关标志物E-cadherin蛋白表达上调,MMP2、SNAI1和Vimentin蛋白表达下调。E-cadherin蛋白的缺失是上皮间质转化的基础,可有效促进肿瘤细胞的侵袭和转移[19]。MMP2属于基质金属蛋白酶家族的一员,有助于细胞间紧密连接的解体和细胞外基质的降解,促进肿瘤细胞的侵袭和转移[20]。SNAI1为驱动上皮间质转化转录通路的主要调控因子,可抑制与上皮表型相



a~b:敲低ADORA3减弱了GBM细胞的侵袭能力;c~d:敲低ADORA3抑制了GBM细胞的上皮间质转化 *:与对照组比较,$P<0.05$;**:与对照组比较,$P<0.01$;***:与对照组比较,$P<0.001$

图4 敲低ADORA3抑制了GBM细胞的侵袭及上皮间质转化

关基因的表达,诱导间充质基因表达,从而促进细胞上皮间质转化进程[21]。上述结果表明,ADORA3可能促进GBM细胞的上皮间质转化。

综上,本研究首次证实了ADORA3在胶质瘤中过表达,其可能通过促进胶质瘤细胞的上皮间质转化引起患者不良预后。

[参考文献]

[1] Xu A, Wang X, Luo J, et al. Overexpressed P75CUX1 promotes EMT in glioma infiltration by activating β-catenin[J]. Cell Death Dis, 2021, 12(2):157-168. doi: 10.1038/s41419-021-03424-1.

[2] Babu D, Mudiraj A, Yada N. Rabeprazole has efficacy per se and reduces resistance to temozolomide in glioma via EMT inhibition[J]. Cell Oncol, 2021, 44(4): 889-905. doi: 10.1007/s13402-021-00609-w.

[3] Yang Y, Wang J, Shi F, et al. BDKRB2 is a novel EMT-related biomarker and predicts poor survival in glioma[J]. Aging, 2021, 13(5):7499-7516. doi: 10.18632/aging.202614.

[4] Xu J, Zhang J, Zhang Z, et al. Hypoxic glioma-derived exosomes promote M2-like macrophage polarization by enhancing autophagy induction[J]. Cell Death Dis, 2021, 12(4):373-389. doi: 10.1038/s41419-021-03664-1.

[5] Teske N, Karschnia P, Weller J, et al. Extent, pattern, and prognostic value of MGMT promotor methylation: does it differ between glioblastoma and IDH-wildtype/TERT-mutated astrocytoma?[J]. J Neurooncol, 2022, 156(2):317-327. doi: 10.1007/s11060-021-03912-6.

[6] Tang X, Xu P, Chen A, et al. Prognostic and predictive value of an immunoscore signature in glioblastoma multiform[J]. Front Genet, 2020, 11(9):514-531. doi: 10.3389/fgene.2020.514363.

[7] Smith HL, Wadhwani N, Horbinski C. Major features of the 2021 WHO classification of CNS tumors[J]. Neurotherapeutics, 2022, 9(6):1691-1704. doi: 10.1007/s13311-022-01249-0.

[8] Yang K, Wu Z, Zhang H, et al. Glioma targeted therapy: insight into future of molecular approaches[J]. Mol Cancer, 2022, 21(1):39-57. doi: 10.1186/s12943-022-01513-z.

[9] Ayoub BM, Attia YM, Ahmed MS. Structural re-positioning, in silico molecular modelling, oxidative degradation, and biological screening of linagliptin as adenosine 3 receptor (ADORA3) modulators targeting hepatocellular carcinoma[J]. J Enzyme Inhib Med Chem, 2018, 33(1):858-866. doi: 10.1080/14756366.2018.1462801.

[10] Bowman RL, Wang Q, Carro A, et al. GlioVis data portal for visualization and analysis of brain tumor expression datasets[J]. Neuro Oncol, 2017, 19(1):139-141. doi: 10.1093/neuonc/now247.

[11] He HR, Li YJ, He GH, et al. The polymorphism in ADORA3 decreases transcriptional activity and influences the chronic heart failure risk in the Chinese[J]. Biomed Res Int, 2018, 18(11):369-385. doi: 10.1155/2018/4969385.

[12] Torres Á, Eriches JI, Sanchez F, et al. Extracellular adenosine promotes cell migration/invasion of glioblastoma stem-like cells through A_3adenosine receptor activation under hypoxia[J]. Cancer Lett, 2019, 446(2):112-122. doi: 10.1016/j.canlet.2019.01.004.

[13] Barkan K, Lagarias P, Stampelout M, et al. Pharmacological characterisation of novel adenosine A_3receptor antagonists[J]. Sci Rep, 2020, 10(1):20781-20791. doi: 10.1038/s41598-020-74521-y.