

DOI: 10.13288/j.11-2166/r.2021.09.015

强心一号复方对脓毒症模型小鼠海马区小胶质细胞极化相关基因表达的影响

王雪蕊, 刘清泉, 徐霄龙, 赵京霞, 王宁, 白云静, 郭玉红✉

首都医科大学附属北京中医医院, 北京市东城区美术馆后街 23 号, 100010

摘要 目的 探讨强心一号复方治疗脓毒症的可能作用机制。方法 36 只雄性 C57BL/6 小鼠随机分为假手术组、模型组、强心组, 每组 12 只。假手术组不结扎穿刺。模型组和强心组采取盲肠结扎打孔法制备脓毒症模型。于造模后 2 h 开始强心组小鼠给予 1 g/(kg·d) 强心一号复方灌胃, 模型组和假手术组给予 1 ml 生理盐水灌胃, 均每日 1 次, 连续 10 天。取各组小鼠海马区组织提取 RNA, 进行高通量测序及结果分析, 并采用 Real-time PCR 检测各组海马组织小胶质细胞极化相关基因 Toll 样受体 4 (Tlr4)、高迁移率族蛋白 B1 (Hmgb1)、白细胞介素 10 (IL-10)、重组人精氨酸酶 1 (Arg-1) 基因表达情况。结果 假手术组、模型组、强心组三组两两比较后差异显著基因共 64 个, 排名前 10 位的基因分别为 Slc11a1、Ephx2、Dusp19、Serhl2、GLP、Atm、Ipo9、Clqtnf9、Tpra1、Cat。与假手术组相比, 模型组海马组织中 Tlr4、Hmgb1、Arg-1 及 IL-10 基因表达水平均显著升高 ($P < 0.05$); 与模型组相比, 强心组海马组织中 Tlr4 和 Hmgb1 基因表达水平显著下降 ($P < 0.05$), Arg-1 及 IL-10 基因表达水平显著升高 ($P < 0.05$)。结论 强心一号复方治疗脓毒症的作用机制可能与调节海马区小胶质细胞极化有关。

关键词 脓毒症; 强心一号复方; 高通量测序; 海马; 小胶质细胞

2016 年国际脓毒症指南将脓毒症定义为机体对感染反应的失控引起的危及生命的器官功能障碍^[1]。脓毒症是 ICU 内死亡的主要原因, 占 ICU 死亡率的 10%~50%^[2]。脓毒症患者常伴有脑功能障碍, 出现谵妄、昏迷、认知功能障碍等表现, 临床称之为脓毒症相关性脑病 (sepsis-associated encephalopathy, SAE)^[3]。研究^[4]表明, 在 ICU 患者中 SAE 的发病率高达 70% 以上。海马区是处理学习记忆等高等过程最主要的脑区, SAE 患者及动物模型中均可检测到海马区结构、功能的异常, 与 SAE 认知功能障碍的发生密切相关^[5-6]。我们认为, 外来之毒与内生毒邪互结是脓毒症的主要病因, 正虚毒损、络脉闭阻是基本病机^[7], 而强心一号复具有扶正解毒通络功效。本课题组前期结果显示, 强心一号复方对脓毒症小鼠死亡率及临床

评分具有改善作用^[8-10]。本研究拟从海马区小胶质细胞极化相关基因表达变化的角度, 结合 RNA 高通量测序技术探讨强心一号复方治疗脓毒症的可能作用机制, 为其临床应用提供理论依据。本研究经北京市中医研究所实验动物伦理委员会批准, 批件号: 2019030012。

1 材料与方法

1.1 动物

SPF 级 C57BL/6J 雄性小鼠共 36 只, 10~12 周龄, 体质量 20~23 g, 购于北京华阜康生物科技股份有限公司, 实验动物生产许可证号: SCXK (京) 2014-0004, 使用许可证号: SCXK (京) 2015-0023。

1.2 药物

强心一号复方组成: 水红花子 30 g, 黄芪 30 g, 茯苓 20 g, 丹参 20 g, 五味子 10 g, 由首都医科大学附属北京中医医院中药房提供。药材按照原方比例, 煎煮浓缩至浓度 1 g/ml。

基金项目: 国家自然科学基金 (81973608, 82004292); 国家科技重大专项 (2017XZ10305501); 国家科技部公共安全风险防控与应急技术装备专项 (2020YFC0841600)

✉ 通讯作者: 8snakes@163.com

1.3 仪器和试剂

高通量测序平台 (Illumina HiSeq 2000 型, 美国 Illumina 公司), 超微量分光光度计 (Nano-Drop2000 型, 美国 Thermo 公司), 生物分析仪 (2100 Bioanalyzer 型, 美国 Agilent 公司), 实时定量 PCR 仪 (ABI7500 型, 美国 Bio-Rad 公司), 台式离心机 (Allegra X-30R 型, 美国 Beckman 公司), 酶标仪 (ELx808 型, 美国 Biotek 公司)。

TruSeq RNA Sample Preparation 试剂盒 (批号 RS-122-2402, 美国 Illumina 公司); AMPure XP 磁珠 (批号 A63881, 美国 Beckman 公司); 反转录试剂盒 (批号 A3500, 美国 Promega 公司); Real-time PCR 试剂盒 (批号 RR047A, 日本 TaKaRa 公司); 戊巴比妥钠 (批号 57-33-0, 上海榕柏生物技术有限公司); Trizol (批号 15596018)、RNase Free H₂O (批号 AM9930), 美国 Thermo 公司。

1.4 分组、造模及给药

采用随机数字表法 36 只小鼠分为假手术组、模型组和强心组, 每组 12 只。模型组和强心组小鼠采用盲肠结扎打孔法制备脓毒症模型^[1]: 采用 1% 戊巴比妥钠 (40 mg/kg) 对小鼠进行腹腔注射麻醉后, 于剑突中线开口, 取出并结扎 1/2 长度盲肠, 使注射器针头于结扎段贯穿盲肠 1 次。假手术组小鼠行假手术操作, 麻醉后于剑突中线开口, 取出盲肠, 不结扎穿刺。术后各组小鼠自由进水进食, 强心组小鼠于造模后 2 h 开始给予 1 g/(kg·d) 强心一号复方灌胃, 模型组和假手术组于造模术后 2 h 开始给予 1 ml 生理盐水灌胃, 均每日 1 次, 连续 10 天。

1.5 取材

灌胃 10 天后 3 组全部小鼠用 1% 戊巴比妥钠 (40 mg/kg) 腹腔注射麻醉, 用含有肝素的 0.9% 氯化钠灌注心脏, 然后进行断头处理。小鼠脑组织放于冰盒上并迅速分离海马组织, 经液氮快速冷冻后按照说明书利用 Trizol 法提取细胞总 RNA。海马组织研磨后依次加入 Trizol、氯仿、异丙醇, 12000 r/min 离心 20 min, 离心温度 4℃, 离心半径 13.5 cm。将沉淀的 RNA 加入 75% 乙醇后 8000 r/min 离心 5 min, 离心温度 4℃, 离心半径 13.5 cm。RNA 溶于 RNase Free H₂O 中, -80℃ 保存待检测。

1.6 高通量测序

采用随机数字表法选取假手术组、模型组、强心组各 5 只小鼠海马组织 RNA 进行高通量测序。RNA 文库构建使用 Illumina 公司生产的 TruSeq RNA Sample Preparation 试剂盒, 按照厂家的标准

流程进行。主要步骤如下: 使用 NanoDrop 测定 RNA 浓度, 琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 的完整性, Agilent 2100 Bioanalyzer 测定 RNA 的 RIN 值, 完成 RNA 样本的质检后, 使用 AMPure XP 磁珠从总 RNA 里分离出带有 poly-A 尾巴的 RNA, 即 mRNA。mRNA 经过片段化后, 逆转录合成 cDNA 第一链和第二链, 逆转录产物的末端经过修补成平末端, 然后在 3' 末端加 A。此片段的两端分别与通用的接头相连接, 其中一个接头带有特异性的条码序列, 用以区分样本的来源。连接产物经过纯化, 去除连接不完整的产物及空的接头自连产物后, 运用与接头序列互补的通用引物对其进行 15 个循环的 PCR 扩增。PCR 扩增产物经过纯化去除引物二聚体, 琼脂糖凝胶电泳质检及浓度测定后, 将浓度统一调整为 2 nmol/L, RNA 文库构建即告完成。待测 RNA 文库在 cBot 上完成聚类生成, 然后将流动细胞转移到 HiSeq 2000 型测序系统上, 按照 Illumina 的标准流程进行二代测序及数据分析。

1.7 Real-time PCR 法测定小鼠海马组织小胶质细胞极化相关基因表达

取假手术组、模型组、强心组各剩余的 7 只小鼠海马组织 RNA 进行 Real-time PCR 检测。按反转录试剂盒说明将 mRNA 转录为 cDNA。分别加入 SYBR Green、PCR Master Mix、RNase Free H₂O 和上下游引物后, 采用实时定量 PCR 仪进行实验。引物均通过 Premier 3 软件设计, 由北京英俊生物科技有限公司合成。引物序列及产物长度如下, Toll 样受体 4 (Tlr4): 上游 5'-CTGGGGAGGCCA-CATCTTCTGG-3', 下游 5'-CTCTGCTGTTTGCTCAG-GATTCC-3', 产物长度 81 bp; 高迁移率族蛋白 B1 (Hmgb1): 上游 5'-CACCCTGGGACTATTAGGAT-3', 下游 5'-GCTCACACTTTTGGGGATAC-3', 产物长度 78 bp; 白细胞介素 10 (IL-10): 上游 5'-GCTGGACAACATACTGCTAACC-3', 下游 5'-ATTTC-CGATAAGGCTTGGCAA-3', 产物长度 78 bp; 重组人精氨酸酶 1 (Arg-1): 上游 5'-GTCCCTAATGA-CAGCTCCTTTC-3', 下游 5'-CCACACTGACTCTTC-CATTCTT-3', 产物长度 102 bp; GAPDH: 上游 5'-CATGGCCTTCCGTGTTTCTTA-3', 下游 5'-GCGGCACGTCAGATCCA-3', 产物长度 138 bp。以 GAPDH 为内参, 将目的基因表达的相对定量值用于统计分析。

1.8 统计学方法

采用 SPSS 19.0 软件进行数据分析, 数据符合

正态分布以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 比较采用单因素方差分析, 方差齐时采用 LSD 检验法, 方差不齐时采用 Dunnett's T^3 检验法。检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 各组小鼠海马组织差异显著基因比较

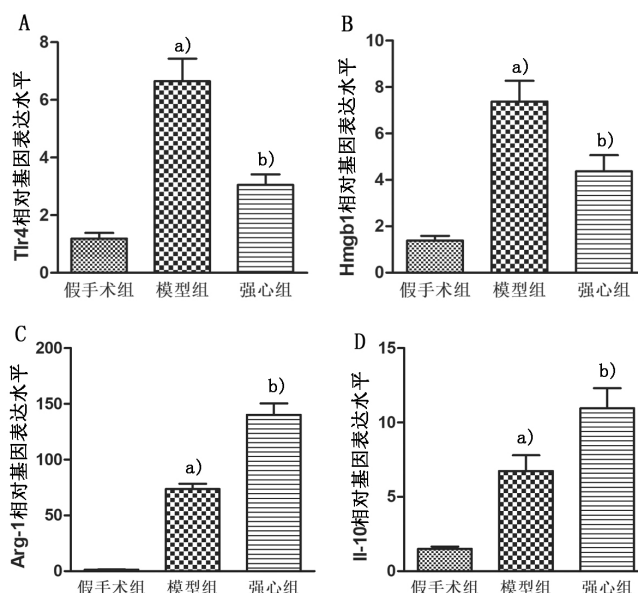
采用高通量测序平台检测各组小鼠海马组织之间的差异基因, 结果显示, 假手术组与模型组相比, 差异显著基因共 2838 个, 其中显著上调基因 1278 个, 显著下调 1560 个; 模型组与强心组相比, 差异显著基因共 1834 个, 其中显著上调基因 985 个, 显著下调 849 个; 假手术组和强心组相比, 差异显著基因共 2411 个, 其中显著上调基因 1326 个, 显著下调 1085 个; 假手术组、模型组、强心组三组两两比较后共同差异显著基因 64 个, 排名前 10 位的基因分别为 Slc11a1、Ephx2、Dusp19、Serhl2、GLP、Atm、Ipo9、Clqtnf9、Tpral、Cat。

2.2 各组小鼠海马组织 Tlr4、Hmgb1、Arg-1 及 IL-10 mRNA 表达比较

图 1 示, 与假手术组相比, 模型组海马组织中 Tlr4、Hmgb1、Arg-1 及 IL-10 基因表达水平均显著升高 ($P < 0.05$); 与模型组相比, 强心组海马组织中 Tlr4 和 Hmgb1 基因表达水平显著下降 ($P < 0.05$), Arg-1 及 IL-10 基因表达水平显著升高 ($P < 0.05$)。

3 讨论

脓毒症的高致病率和高死亡率一直是全球面临的重大难题, 而 SAE 是患者在 ICU 期间脓毒症的发病率和死亡率增高的重要原因, 伴有 SAE 的脓毒症患者病死率上升约 20%, 可达到 70% 左右^[13]。而幸存的 SAE 患者多伴有认知障碍、抑郁症、创伤后应激障碍和记忆存储损伤等远期神经系统症状, 是导致生活质量下降和医疗成本增加的主要原因^[13]。SAE 可属中医学“神昏”“痴呆”范畴。SAE 患者多以虚实夹杂为主, 虚是由于气血亏虚、肾精不足等原因, 实则由于热邪、痰饮、血瘀等实邪困扰。虚实互作, 导致心脑等清窍气机逆乱, 治疗当以扶正解毒通络为主^[14]。强心一号复方中黄芪补气升阳、养血益中; 茯苓宁心安神、益气生津; 丹参通络活血; 水红花子利水化痰消积; 五味子养阴益气、镇惊安神。全方既可兼顾气血亏虚、温阳补气, 又可行水消积、祛除实邪。



注: Tlr4, Toll 样受体 4; Hmgb1, 高迁移率族蛋白 B1; IL-10, 白细胞介素 10; Arg-1, 重组人精氨酸酶 1。

a) 与假手术组比较, $P < 0.05$; b) 与模型组比较, $P < 0.05$ 。

图 1 各组小鼠海马组织 Tlr4、Hmgb1、Arg-1 及 IL-10 mRNA 表达比较

本研究利用高通量测序技术, 发现脓毒症小鼠海马区多种基因表达水平均出现变化, 这些基因表达的变化可能参与了脓毒症小鼠认知功能障碍的发生机制。而强心一号复方干预引起了多种基因的表达上调或下调, 同时发现 64 个三组比较差异均显著的相关基因, 结果提示强心一号复方对 SAE 的治疗机制很有可能跟这些基因的表达水平变化有关。其中, Slc11a1 表达于巨噬细胞、中性粒细胞等髓系细胞, 可调控巨噬细胞的糖基化和磷酸化。研究^[15-16]表明, Slc11a1 参与细菌性肺炎、过敏性哮喘等多种感染性疾病及自身免疫性疾病的发生发展过程。环氧二十碳三烯酸是一种重要的脂质介质, 能主动调节多种组织的增殖、迁移和炎症反应, 而 Ephx2 可代谢环氧二十碳三烯酸, 在前列腺癌、炎症性肠病等多种疾病中发挥抗肿瘤和抗炎的作用^[17-18]。

脓毒症发生时, 血脑屏障受损, 使得外周免疫细胞和炎症因子、细菌壁成分等迁移入大脑, 激活脑内免疫炎症细胞, 引起中枢神经炎症反应和氧化应激, 损伤海马区域, 导致认知功能障碍^[19]。既往研究^[20-21]表明, 海马区的免疫炎症因子分泌异常、神经元细胞损伤、凋亡、突触可塑性下降等病理生理过程均是导致 SAE 发生发展的重要原因。小胶质细胞具有重要的功能, 参与突触的修剪、突

棘的形成、吞噬神经元、介导神经炎症反应等过程^[2]。在脓毒症情况下,小胶质细胞迅速激活。根据其分泌细胞因子的不同,激活的小胶质细胞可以分为两种极化表型,即促炎的经典激活型(M1型)和抑炎的选择性激活型(M2型)^[3]。M1型巨噬细胞在受到Th1细胞产物或脂多糖(LPS)刺激下形成,通过激活Toll样受体途径促进炎症因子的转录和翻译;M2型巨噬细胞是受到Th2类细胞因子刺激诱导下形成的,可分泌抗炎因子如白细胞介素4(IL-4)、IL-10等,主要发挥抑炎、神经保护和修复的作用^[4]。既往研究^[5]表明,Tlr4和Hmgb1基因是经典的M1型巨噬细胞标志物,而Arg-1和IL-10基因是M2型巨噬细胞标志物。本研究结果显示,模型组海马区Tlr4、Hmgb1、Arg-1及IL-10基因表达水平均较假手术组显著上调,而强心一号复方可以显著下调Tlr4和Hmgb1的基因表达水平,同时上调Arg-1及IL-10的基因表达水平,提示强心一号复方对脓毒症脑功能障碍的治疗作用可能与抑制海马区小胶质细胞向促炎型极化、促进小胶质细胞向抑炎型极化的机制有关。

本研究基于高通量测序技术,该技术具有快速高通量、高灵敏等特点,但基于生物信息分析流程可能出现的假阳性,其结论需要进一步的验证。同时,强心一号复方对脓毒症海马区小胶质细胞激活、神经元细胞损伤及凋亡等过程是否具有调控作用及其分子机制是什么,亦需要进一步研究。

参考文献

- [1] SHANKAR-HARI M, PHILLIPS GS, LEVY ML, et al. Developing a new definition and assessing new clinical criteria for septic shock: For the third international consensus definitions for sepsis and septic shock (Sepsis-3) [J]. JAMA, 2016, 315(8): 775-787.
- [2] COHEN J, VINCENT JL, ADHIKARI NK, et al. Sepsis: a roadmap for future research [J]. Lancet Infect Dis, 2015, 15(5): 581-614.
- [3] HELBING DL, BÖHM L, WITTE OW. Sepsis-associated encephalopathy [J]. CMAJ, 2018, 190(36): E1083. doi: 10.1503/cmaj.180454.
- [4] SONNEVILLE R, DE MONTMOLLIN E, POUJADE J, et al. Potentially modifiable factors contributing to sepsis-associated encephalopathy [J]. Intensive Care Med, 2017, 43(8): 1075-1084.
- [5] ORHUN G, TÜZÜN E, BILGIÇ B, et al. Brain volume changes in patients with acute brain dysfunction due to sepsis [J]. Neurocrit Care, 2020, 32(2): 459-468.
- [6] GAO R, LI G, YANG R, et al. Hippocampal β 2-microglobulin mediates sepsis-induced cognitive impairment [J]. Mol Med Rep, 2018, 17(6): 7813-7820.
- [7] 赵红芳, 江其敏, 刘清泉. 刘清泉教授应用中医药治疗脓毒症的临床经验 [J]. 中国中医急症, 2017, 26(9): 1563-1565.
- [8] 王雪蕊, 徐霄龙, 白云静, 等. 强心一号复方对脓毒症小鼠心脏的保护作用及机制 [J]. 中医杂志, 2019, 60(24): 2133-2137.
- [9] 王雪蕊, 徐霄龙, 黄坡, 等. 强心一号复方对脓毒症小鼠心肌细胞凋亡的影响 [J]. 中国中医急症, 2020, 29(5): 769-772.
- [10] XU X, LIU Q, HE S, et al. Qiang-Xin 1 formula prevents sepsis-induced apoptosis in murine cardiomyocytes by suppressing endoplasmic reticulum- and mitochondria-associated pathways [J]. Front Pharmacol, 2018, 9: 818. doi: 10.3389/fphar.2018.00818.
- [11] MISHRA SK, CHOUDHURY S. Experimental protocol for cecal ligation and puncture model of polymicrobial sepsis and assessment of vascular functions in mice [J]. Methods Mol Biol, 2018, 1717: 161-187. doi: 10.1007/978-1-4939-7526-6_14.
- [12] WILSON JX, YOUNG GB. Progress in clinical neurosciences: sepsis-associated encephalopathy: evolving concepts [J]. Can J Neurol Sci, 2003, 30(2): 98-105.
- [13] ZHANG LN, WANG XT, AI YH, et al. Epidemiological features and risk factors of sepsis-associated encephalopathy in intensive care unit patients: 2008-2011 [J]. Chin Med J (Engl), 2012, 125(5): 828-831.
- [14] 黄坡, 赵京霞, 苏芮, 等. 刘清泉教授对脓毒症相关性脑病的认识及其中医研究思路探讨 [J]. 世界中医药, 2018, 13(10): 2390-2392, 2395.
- [15] POWELL DA, FRELINGER JA. Efficacy of resistance to Francisella imparted by ITY/NRAMP/SLC11A1 depends on route of infection [J]. Front Immunol, 2017, 8: 206. doi: 10.3389/fimmu.2017.00206.
- [16] CUNRATH O, BUMANN D. Host resistance factor SLC11A1 restricts Salmonella growth through magnesium deprivation [J]. Science, 2019, 366(6468): 995-999.
- [17] REISDORF WC, XIE Q, ZENG X, et al. Preclinical evaluation of EPHX2 inhibition as a novel treatment for inflammatory bowel disease [J]. PLoS One, 2019, 14(4): e0215033.
- [18] LIU MS, ZHAO H, XU CX, et al. Clinical significance of EPHX2 deregulation in prostate cancer [J]. Asian J Androl, 2020. doi: 10.4103/aja.aja_34_20.
- [19] NWAFOR DC, BRICHACEK AL, MOHAMMAD AS, et al. Targeting the blood-brain barrier to prevent sepsis-

- associated cognitive impairment [1]. J Cent Nerv Syst Dis, 2019, 11: 1179573519840652. doi: 10. 1177/1179573519840652.
- [20] ZONG MM, ZHOU ZQ, JI MH, et al. Activation of $\beta 2$ -Adrenoceptor attenuates sepsis-induced hippocampus-dependent cognitive impairments by reversing neuroinflammation and synaptic abnormalities [J]. Front Cell Neurosci, 2019, 13: 293. doi: 10. 3389/fncel. 2019. 00293.
- [21] LIN L, CHEN X, ZHOU Q, et al. Synaptic structure and alterations in the hippocampus in neonatal rats exposed to lipopolysaccharide [J]. Neurosci Lett, 2019, 709: 134364. doi: 10. 1016/j. neulet. 2019. 134364.
- [22] WESTHOFF D, ENGELEN-LEE JY, HOOGLAND ICM, et al. Systemic infection and microglia activation: a prospective postmortem study in sepsis patients [J]. Immun Ageing, 2019, 16: 18. doi: 10. 1186/s12979-019-0158-7.
- [23] MICHELS M, VILA P, PESCADOR B, et al. Microglial Cells depletion increases inflammation and modifies microglial phenotypes in an animal model of severe sepsis [J]. Mol Neurobiol, 2019, 56(11): 7296 – 7304.
- [24] MICHELS M, SONAI B, DAL-PIZZOL F. Polarization of microglia and its role in bacterial sepsis [J]. J Neuroimmunol, 2017, 303: 90 – 98. doi: 10. 1016/j. jneuroim. 2016. 12. 015.
- [25] XU X, GUO Y, ZHAO J, et al. Punicalagin, a PTP1B inhibitor, induces M2c phenotype polarization via up-regulation of HO-1 in murine macrophages [J]. Free Radic Biol Med, 2017, 110: 408 – 420. doi: 10. 1016/j. freeradbiomed. 2017. 06. 014.

The Effect of *Qiangxin No. 1 Compound* (强心一号复方) on the Expression of Microglia Polarization-related Genes in the Hippocampus of Epsis Model Mice

WANG Xuerui, LIU Qingquan, XU Xiaolong, ZHAO Jingxia, WANG Ning, BAI Yunjing, GUO Yuhong

Beijing Hospital of Traditional Chinese Medicine, Capital Medical University, Beijing, 100010

ABSTRACT Objective To explore the possible mechanism of *Qiangxin No. 1 Compound* (QX1, 强心一号复方) in treating sepsis. **Methods** Thirty-six male C57BL/6 mice were randomly divided into sham operation group, model group, and QX1 group, with 12 mice in each group. Cecal ligation and perforation was performed on mice in the model group and QX1 group to establish a sepsis model, while no ligation and puncture was given to the sham operation group. Two hours after the modeling, QX1 at a dose of 1 g/ (kg · d) was given by gavage in QX1 group, while 1 ml normal saline was given by gavage in the model group and sham operation group, once daily for 10 consecutive days. RNA was extracted from the hippocampus tissues of the mice and were analyzed by high-throughput sequencing method. Real-time PCR was used to detect the expression of microglial polarization-related genes including Toll-like receptor 4 (Tlr4), high mobility group protein b1 (Hmgb1), interleukin 10 (IL-10), and recombinant human arginase 1 (Arg-1) genes. **Results** The pairwise comparison analysis showed that there were significant differences in 64 genes between the two groups of sham operation group, model group and QX1 group, of which the top 10 genes were Slc11a1, Ephx2, Dusp19, Serhl2, GLP, Atm, Ipo9, C1qtnf9, Tpra1, and Cat. Compared to those of the sham operation group, the expression levels of Tlr4, Hmgb1, Arg-1 and IL-10 genes in the hippocampus of the model group significantly increased ($P < 0.05$). Compared to the model group, the QX1 group had significantly lower expression levels of Tlr4 and Hmgb1 genes in the hippocampus ($P < 0.05$), as well as higher expression levels of Arg-1 and IL-10 genes ($P < 0.05$). **Conclusion** QX1 may exert an effect on sepsis by regulating the polarization of microglia in the hippocampus.

Keywords sepsis; *Qiangxin No. 1 Compound* (强心一号复方) ; high-throughput sequencing; hippocampus; microglia

(收稿日期: 2020 - 07 - 21; 修回日期: 2020 - 12 - 03)

编辑: 邓 媛