·实验研究·

五苓散同方汤剂缺失成分对氧糖剥夺后星形胶质细胞水肿及水通道蛋白4表达的影响

吴　桐,孙彩霞,王建农,刘良裕,杨宇珂

(中国中医科学院西苑医院基础医学研究所/中药药理北京市重点实验室,北京 100091)

[摘要]　**目的:**探讨5种五苓散同方汤剂缺失成分对氧糖剥夺并复氧后星形胶质细胞水肿及其水通道蛋白4(AQP4)表达的影响。**方法:**星形胶质细胞分为正常组、模型组、桂皮醛(CIN)组、23-乙酰泽泻醇B(ALB)组、麦角甾醇(ERG)组、茯苓酸(PA)组、白术内酯Ⅰ(ATR)组、成分组合(MCC)组及奥扎格雷(OZA)组。用MTT法评价对细胞的抑制率,以乳酸脱氢酶(LDH)漏出率反映细胞的损伤程度,用Western Blot法测定AQP4的表达变化。**结果:**氧糖剥夺2 h后复氧6 h,LDH漏出率明显增加($P<0.01$),浓度10 μg·mL^{-1}的ALB,0.01 μg·mL^{-1}的PA和ATR及0.1 μg·mL^{-1}的MCC的干预能明显降低氧糖剥夺后复氧LDH漏出率增高的程度($P<0.01$)。氧糖剥夺后复氧条件下,各组AQP4表达存在明显差异。与正常组相比,模型组AQP4在氧糖剥夺后复氧条件下蛋白表达显著增加($P<0.01$);与模型组相比,CIN,ALB,ERG,PA,ATR及MCC组的AQP4在氧糖剥夺后复氧条件下的蛋白表达变化趋势相似,但CIN,ALB,ERG,PA,ATR及MCC组AQP4蛋白表达均明显降低($P<0.01$)。**结论:**五苓散同方汤剂5种主要缺失成分能显著减轻2 h氧剥夺后复氧6 h的星形胶质细胞水肿,机制可能与其通过降低AQP4蛋白表达水平有关。

[关键词]　五苓散;星形胶质细胞;成分缺失;AQP4;脑水肿

[中图分类号]　R932　　[文献标志码]　A　　[文章编号]　1003－3734(2021)06－0540－06

Effects of 5 main missing chemical components in the decoction of Wuling Powder on swelling of astrocyte and expression of AQP4 after oxygen-glucose deprivation

WU Tong, SUN Cai-xia, WANG Jian-nong, LIU Liang-yu, YANG Yu-ke

(*Beijing Key Laboratory of Chinese Materia Pharmacology, Institute of Basic Medical Sciences of Xiyuan Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing* 100091, *China*)

[**Abstract**]　**Objective**: To investigate the effects of five missing components in the Decoction of Wuling Powder on astrocyte edema and aquaporin4 (AQP4) expression after oxygen glucose deprivation and reoxygenation. **Methods**: Astrocytes were divided into normal group, model group, cinnamaldehyde (CIN) group, alisol B 23-acetate (ALB) group, ergosterol (ERG) group, pachymic acid (PA) group, atractylenolide Ⅰ (ATR) group, medicinal chemical composition (MCC) group and ozagrel (ozagrel, OZA) group. MTT method was used to evaluate the drug's inhibitory rate on the cells, the lactate dehydrogenase (LDH) leakage rate was used to reflect the degree of cell damage, and Western blot method was used to determine the expression change of AQP4. **Results**: After 2 hours of oxygen glucose deprivation and 6 hours of reoxygenation, the LDH leakage rate was significantly increased

[基金项目]　国家自然科学基金资助项目(30873359)

[作者简介]　吴桐,女,硕士研究生,主要从事中药药效物质基础研究。联系电话:(010)62835620,E-mail:wut_tcm@163.com。

[通讯作者]　王建农,男,研究员,主要从事中药药效物质基础及作用机制研究。联系电话:(010)62835620,E-mail:wangjiannong2008@sina.com。

($P<0.01$). ALB at a concentration of 10 μg·mL^{-1}, PA and ATR at 0.01 μg·mL^{-1}, and MCC at 0.1 μg·mL^{-1} could significantly reduce the increase in the leakage rate of reoxygenation LDH after oxygen glucose deprivation ($P<0.01$). The expression of AQP4 under oxygen and glucose deprivation and reoxygenation conditions showed significant differences among the groups. Compared with the normal group, the expression of AQP4 in the model group was significantly increased after oxygen glucose deprivation under reoxygenation conditions ($P<0.01$). Compared with the model group, the expression trends of AQP4 in the CIN, ALB, ERG, PA, ATR and MCC groups under reoxygenation conditions after oxygen glucose deprivation were similar, but the AQP4 protein expressions in the CIN, ALB, ERG, PA, ATR, and MCC groups were all significantly reduced ($P<0.01$). **Conclusion**: The five main missing components in the decoction of Wuling Powder can significantly reduce the astrocyte edema after 2 hours of oxygen deprivation and 6 hours of reoxygenation, which may be related to the decrease of AQP4 protein expression level.

[**Key words**] Wuling Powder; astrocytes; chemical components deficiency; AQP4; brain edema

五苓散出自张仲景《伤寒论》,其方剂主要采用汤剂,仅少数如四逆散、五苓散等 12 首方选择散剂[1]。大量临床实践表明,经典宜散方剂以超乎寻常的小剂量应用,不仅具有同方汤剂无法替代且无可质疑的确切临床疗效,而且毒副作用显著减小。然而现代临床应用的五苓散却是其同方汤剂[2],且未见任何能够证明五苓散汤剂与原方散剂临床疗效相当的文献报道。课题组前期通过典型病例分析证实,五苓方同方散剂对肾性水肿患者消除水肿、减轻体重的作用显著优于其同方汤剂[3]。将宜散不宜汤的五苓方同方汤散的化学表征结果与临床疗效进行关联性分析表明,五苓散同方汤剂中所缺失的大量低极性分子组合,是导致五苓方散剂临床药效显著优于其同方汤剂的分子机制[4]。

五苓散主治太阳经腑同病之蓄水证,临床广泛应用于治疗多种难治性水肿疾病,近年来在脑水肿的治疗方面效果尤为突出[5-7]。星形胶质细胞是中枢神经系统内数量最多和分布广泛的细胞群体,也是中枢神经系统的主要胶质细胞,无论是细胞毒性脑水肿还是血管源性脑水肿,星形胶质细胞均是脑创伤和脑缺血后肿胀细胞的主要类型,其肿胀均发生在脑水肿的早期,为脑水肿发展过程中的一个重要表现[8]。水通道蛋白(aquaporins, AQPs)是在脑水稳态和由脑损伤引起的脑水肿中起重要作用的水通道,其中 AQP4 是特征最明显的 AQP,在急性脑损伤后水肿的形成和消退中发挥重要作用[9]。然而关于五苓散同方汤剂中所缺失的大量低极性成分能否通过调控星形胶质细胞 AQP4 的表达,抑制脑水肿尚有待深入研究。因此,本文采用原代培养的大鼠皮层星形胶质细胞氧糖剥夺方法,构建脑缺血的细胞模型,以从体外评价五苓散同方汤剂缺失成分对脑水肿的影响,以期对五苓散的合理用药提供科学依据,揭示经典散剂宜散不宜汤的科学内涵。

材　料

1　药物与试剂

桂皮醛(批号:10710-201821)、23-乙酰泽泻醇 B(批号:111846-201705)、麦角甾醇(批号:111845-201604)、白术内酯Ⅰ(批号:111975-201501)购自中国食品药品检定研究院;茯苓酸(批号:29070-92-6)、混合药物(由桂皮醛、23-乙酰泽泻醇 B、麦角甾醇、白术内酯Ⅰ和茯苓酸以 25∶3∶2∶1∶1 比例组成)、奥扎格雷(批号:130952-46-4)购自北京亿诺辉科技发展有限公司;PBS(批号:KGB5001)、免疫组化笔(批号:KGSP10)、LDH 试剂盒(批号:KGT02448)购自江苏凯基生物技术股份有限公司;特异性胶原纤维酸性蛋白(glial fibrillary acid protein, GFAP)抗体(批号:ab33922,美国 Abcam 公司);胎牛血清(美国 Gibco 公司);无糖 DMEM 培养基(美国 Sigma 公司);AQP4 多克隆抗体(批号:PB0500)及羊抗兔抗体(批号:KGAA35)购自美国 Boster Biological Technology 公司;MTT(批号:0793,美国 Amresco 公司);DMSO(批号:20120322,上海久亿化学试剂有限公司);DMSO(批号:D2650,美国 Sigma 公司)。

2　仪器

THZ－312 型台式恒温振荡器(上海精宏实验设备有限公司);101AS－3 型电热扶风干燥箱(上海圣欣科学仪器有限公司);710 型激光共聚焦显微

镜(德国 Zeiss 公司);E200 型天平(德国 Sartorius 公司),SW－CJ－1FD 型超净工作台(苏州净化设备有限公司);IX51 型生物倒置显微镜(日本 Olympus 公司);ELx800 型酶标仪(美国 BioTek 公司),WH－2 型振荡器(上海沪西分析仪器厂)。

3 动物

雄性 SD 乳鼠,新生 2 d,SPF 级,45 只,由南京医科大学实验动物中心提供,生产许可证号:SCXX(苏)201817149。

方 法

1 星形胶质细胞原代培养

取新生 2 d 内的 SD 乳鼠,取大脑皮层剪碎并消化后接种到培养瓶中,置于 37 ℃,20% O_2 的孵箱恒温培养 1 h,将细胞悬液换至有多聚赖氨酸涂底的培养瓶,隔 2 d 换液,7 d 后 37 ℃,200 r·min^{-1}水平振荡 18 h,换液,细胞长满至 95% 瓶底时,以 0.25% 胰蛋白酶消化离心,重复传代至第 3 代时,用特异性 GFAP 抗体对星形胶质细胞行免疫荧光染色,鉴定成熟、纯化的星形胶质细胞。

2 氧糖剥夺模型建立

去掉星形胶质细胞的含血清的 DMEM/F12 培养基,用 PBS 冲洗 2 次,换为未添加血清的无糖 DMEM 培养基,置于含 1% O_2 的孵箱进行 2 h 时长的氧糖剥夺,此后再给细胞换回含血清的 DMEM/F12 培养基,并于 20% O_2 的孵箱行复氧培养,至规定时间点时进行实验。

3 最佳复氧时间的选择

细胞氧糖剥夺 2 h 后复氧 6,12,24 和 48 h,用完全培养基稀释药,复氧同时加入 100 μL 相应的含药培养基,同时设立阴性对照组。将 96 孔板进行 MTT 染色,λ=490 nm,测定吸光度(A)值,计数各组别抑制率。抑制率(%)=(1－给药组 A 值/空白对照组 A 值)×100%。

4 药物浓度筛选与分组

将星形胶质细胞配制成浓度为 5×10^4 个·mL^{-1} 的细胞悬液,接种于 96 孔细胞培养板中,每孔加入 100 μL 细胞悬液,置于 37 ℃,5% CO_2 培养箱中培养 24 h;细胞氧糖剥夺 2 h 后,复氧至最佳复氧时间点,药物稀释后继续复氧,并加入 100 μL 相应的含药培养基,同时设立空白对照组;将 96 孔板进行 MTT 染色,用酶标仪在 490 nm 处,测定 A 值,计算细胞增殖抑制率,选出受试药物最佳浓度。

将星形胶质细胞分为 9 组:正常组(无任何处理)、模型组(只进行氧糖剥夺)、CIN 干预组、ALB 干预组、ERG 干预组、PA 干预组、ATR 干预组、MCC 干预组和 OZA 干预组(氧糖剥夺后,分别给予相应浓度的药物干预)。

5 乳酸脱氢酶(LDH)漏出率测定

各给药组细胞加药处理后,严格按照 LDH 检测试剂盒使用说明书进行检测,不同组液体分别与辅酶Ⅰ混匀后于 37 ℃水浴 15 min 后,加入 2,4-二硝基苯肼混匀后于 37 ℃水浴 15 min 后,加入 0.4 M NaOH 溶液,混匀,室温放置 5 min,用酶标仪于 450 nm 下测定 A 值。按如下公式计算 LDH 含量,以胞外含量与总含量之比为 LDH 漏出率。LDH 含量(U·L^{-1})=(测定 A 值－空白 A 值)/(标准 A 值－空白 A 值)×标准管浓度(0.2 μmol·mL^{-1})×1 000 mL×测试前药物稀释倍数。

6 Western Blot 法检测 AQP4 蛋白表达[10]

使用预冷 PBS 洗涤细胞 3 次,RIPA 细胞裂解液提取总蛋白,加入考马斯亮蓝 G250 染液定量,加样、电泳,转膜 120 min 后用 TBST 洗膜 3 次,10 min·次$^{-1}$,然后加入目的蛋白 AQP4 和内参 GAPDH 的一抗,4 ℃孵育过夜,二抗室温振荡 2 h。以 ECL 显色,G:BOX chemiXR5 进行成像,以 Gel-Pro32 软件分析图像灰度值。一抗 4 ℃孵育过夜,二抗温室孵育 1.5 h,显色,定影。以 GAPDH 作为内参,AQP4/GAPDH 积分值为 AQP4 蛋白相对表达量。

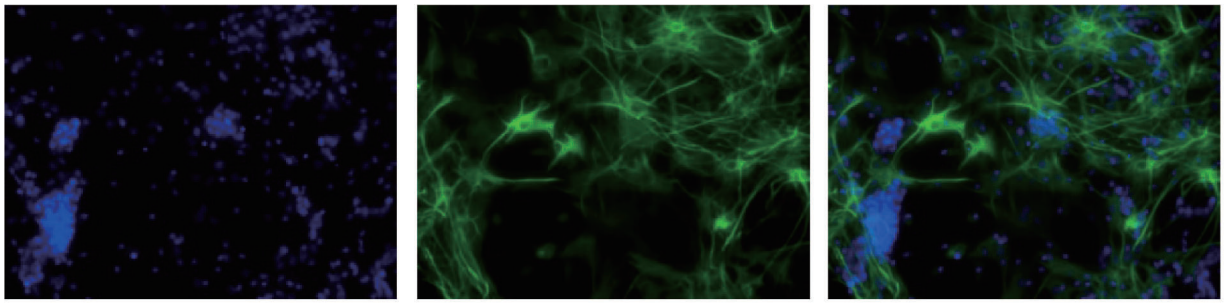
7 统计学分析

结果以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,采用 SPSS 20.0 进行分析,组间比较采用 ANOVA 单因素方差分析,采用 LDS t-test 分析方法进行两两比较,$P<0.05$ 认为有显著差异。

结 果

1 星形胶质细胞的原代培养及鉴定

GFAP 属于Ⅲ类中间丝状体,特异地表达于中枢神经系统星形胶质细胞的胞质内,可以作为星形胶质细胞特异性标志物[11],因此常采用 GFAP 来鉴定星形胶质细胞。星形胶质细胞培养成功后,以 GFAP 抗体免疫荧光染色,荧光显微镜下可见星形胶质细胞占所有细胞比例超过 98%,可进行后续实验(见图 1)。



蓝色:细胞核,用于定位;绿色:目的蛋白,用于定性

图 1 原代成熟的星形胶质细胞 GFAP 免疫荧光鉴定(×200)

2 最佳复氧时间的选择

模型组星形胶质细胞在 2 h 氧糖剥夺培养至 1 h 时,出现边缘褶皱,细胞体积增大,至 6 h 形态变化,细胞肿胀加重,部分坏死细胞脱落,细胞抑制率达到 44.82%,12 h 时,细胞抑制率已达 56.17%,至 24 h 细胞肿胀有所缓解,但仍有明显肿胀,细胞抑制率为 70.62%,至 48 h 细胞脱落严重,细胞抑制率达到 77.26%,因此本实验选择 6 h 作为最佳复氧时间,见表 1。

表 1 不同复氧时间对细胞增殖的抑制作用

$\bar{x} \pm s, n = 3$

组别	A 值	抑制率/%
正常组	0.77 ± 0.02	—
缺糖氧/复氧 6 h	0.43 ± 0.03[a]	44.82
缺糖氧/复氧 12 h	0.34 ± 0.02[a]	56.17
缺糖氧/复氧 24 h	0.23 ± 0.02[a]	70.62
缺糖氧/复氧 48 h	0.18 ± 0.02[a]	77.26

与正常组比较,a:$P < 0.001$

3 受试药物最佳浓度的选择

为了避免 6 种干预药物本身对星形胶质细胞的损伤作用,本实验设置 0.01,0.1,1.0,10 和 100 μg·mL^{-1} 5 个浓度梯度,通过对细胞的抑制作用,来评价药物细胞毒性。ERG,CIN,ALB 对星形胶质细胞的抑制率均在 10% 以下,而 ATR 在 0.1 μg·mL^{-1} 时细胞抑制率为 14.63%,PA 在 0.1 μg·mL^{-1} 时细胞抑制率为 11.25%,浓度 > 0.1 μg·mL^{-1} 时 MCC 的抑制率急剧上升,1.0 μg·mL^{-1} 的 MCC 细胞抑制率达到 42.10%,OZA 在浓度 > 10 μg·mL^{-1} 后,细胞抑制率明显增加。因此,最终确定 CIN,ALB,ERG 及 OZA 的干预浓度为 10 μg·mL^{-1},PA 和 ATR 的干预浓度为 0.01 μg·mL^{-1},MCC 的干预浓度为 0.1 μg·mL^{-1}(结果见图 2)。

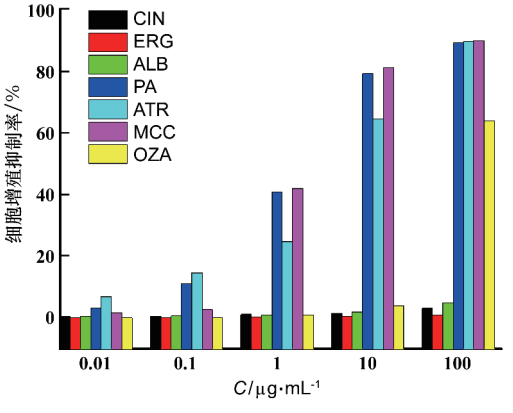


图 2 不同浓度药物对细胞增殖的抑制作用

4 星形胶质细胞 LDH 漏出量的影响

LDH 主要分布在细胞质内,在细胞膜受损后被释放到胞外培养基,可作为检测细胞膜完整性的标志物。各组药物分别干预星形胶质细胞后,星形胶质细胞 LDH 漏出率均呈明显增加趋势。表 2 显示,与空白对照组相比,模型组 LDH 漏出率明显增加($P < 0.01$);与模型组相比,各给药组均可不同程度降低对星形胶质细胞的细胞毒作用,除 CIN 和 ERG 外,ALB,ATR,PA,MCC 和 OZA 组均可显著降低 LDH 漏出率;与阳性药 OZA 相比,各组均无显著性差异。

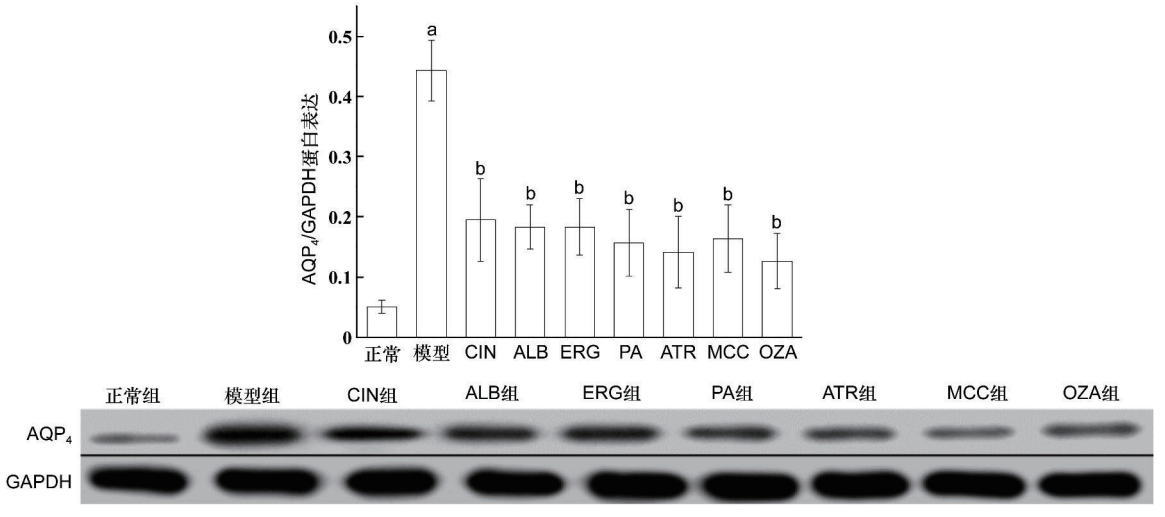
表 2 不同缺失成分对细胞 LDH 漏出率的影响 $\bar{x} \pm s$, $n = 3$

组别	正常	模型	CIN	ALB	ERG	ATR	PA	MCC	OZA
LDH 漏出率/%	30.57 ± 1.47	57.84 ± 1.55[a]	55.9 ± 0.57	53.58 ± 0.87[b]	55.44 ± 1.12	52.5 ± 1.37[b]	53.23 ± 2.69[b]	51.28 ± 2.44[b]	53.38 ± 2.16[b]

与正常组比较,a:$P < 0.01$;与模型组比较,b:$P < 0.01$

5 不同成分对星形胶质细胞 AQP4 蛋白表达的影响

正常的星形胶质细胞会有少量 AQP4 蛋白的表达。图 3 显示,与正常组相比,模型组星形胶质细胞 AQP4 蛋白表达量显著增加($P<0.01$);各给药组 AQP4 蛋白表达量亦有所增加,但与模型组相比,各给药组均可显著降低星形胶质细胞的 AQP4 蛋白表达量,差异具有统计学意义($P<0.01$)。



与正常组比较,a:$P<0.001$;与模型组比较,b:$P<0.01$

图 3 不同缺失成分对 AQP4 蛋白表达的影响

讨 论

脑水肿是脑损伤的常见特征,可导致颅内压升高和局部缺血,从而使病情恶化加速。目前对水肿的治疗方法主要在于降低颅内压,但尚无针对直接参与水肿过程的分子因素的治疗方法。血管周星形胶质细胞在脑内离子稳态和水平衡的调节中起着至关重要的作用。AQPs 作为星形胶质细胞的水通道已成为水肿调节的主要靶点,其中 AQP4 对脑水肿的形成及水平衡的影响最大[12-13]。研究表明,AQP4 在脑缺血早期表达量增多,导致脑内水分增加,从而加重脑水肿的形成[14]。因此调节脑内星形胶质细胞 AQP4 的表达有利于改善缺血性脑水肿。

脑缺血后损伤主要表现为缺氧和缺糖,脑细胞损害的本质主要是脑组织氧糖缺乏而导致的结果,大多数患者主要选择性去除起关键作用的葡萄糖和氧以代表缺血所致的低营养条件[8]。因此,本研究采用氧糖剥夺方法模拟星形胶质细胞的缺血性损伤,从体外研究五苓散同方汤剂所缺失的关键低极性成分对星形胶质细胞 AQP4 蛋白表达的影响。

五苓散方中以泽泻为君药,泽泻性寒,味淡、甘,可利水渗湿。茯苓、猪苓为臣药,茯苓和猪苓味甘,性淡、平,两药合用不但可以加强君药利水渗湿之功,还可配伍白术健脾制水。白术、桂枝为佐药,白术健脾而运化水湿之邪,桂枝温阳化气而利水,外散风寒以解表。诸药合用,共奏淡渗利湿、健脾助运、温阳化气、解表散邪之功。前期研究发现,五苓散汤剂提取液中明显缺失 23-乙酰泽泻醇 B、桂皮醛、白术内酯Ⅰ,而麦角甾醇甚至完全缺失[4],这几种关键缺失成分分别为泽泻、桂枝、白术和猪苓的主要指标成分。茯苓酸是茯苓中健脾利水的三萜类活性成分[15]。

本研究结果显示,桂皮醛、23-乙酰泽泻醇 B 和麦角甾醇对星形胶质细胞的抑制作用较小,而茯苓酸和白术内酯Ⅰ的抑制作用较大,5 种缺失成分的组合也明显抑制星形胶质细胞的增殖活性。在最佳药物作用浓度范围内,5 种缺失成分和混合药物组均能显著下调星形胶质细胞中 AQP4 表达,且茯苓酸和白术内酯Ⅰ对 AQP4 的调节作用程度更明显,但茯苓酸对细胞本身的抑制作用较大,白术内酯Ⅰ较不稳定,易转化为其他内酯类结构。而 5 种成分的混合给药组对细胞的抑制作用较小,且可显著下调 AQP4 表达,从而减轻氧糖剥夺对细胞的损伤,是治疗脑水肿的潜在开发药物。

综上所述,本研究再次证实了五苓散同方汤剂中所缺失的低极性成分具有显著“利水”作用,从细

胞水平支持了前期五苓汤/散临床对照研究,从药效物质基础角度揭示了传统医学因药制宜用散的科学意义。后期将围绕全身水液代谢疾病,对多种五苓散证模型的细胞及动物实验进行验证,为五苓散/汤临床疗效差异提供充分的科学依据,从药效物质基础角度加强现代医学对中医临床用药的认可。

[参 考 文 献]

[1] 王建农, 张广德, 余仁欢, 等. 从同方汤散临床疗效差异思考传统中药剂型的深刻内涵[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(4): 185 - 187.

[2] 谭华儒,朱奎华,李良明. 五苓散治疗特发性水肿 60 例临床观察[J]. 时珍国医国药, 2008, 19(9): 2288 - 2289.

[3] 金汝真, 余仁欢, 高辉, 等. 五苓散与五苓汤治疗肾病综合征水湿内停证的临床对照研究[J]. 中医杂志, 2012, 53(7): 572 - 573, 577.

[4] 孙彩霞, 王建农, 韩林. 五苓方汤、散剂低极性化学成分差异研究[J]. 中药材, 2016, 39(2): 367 - 370.

[5] 周小毛, 任醒华, 张家明, 等. 五苓散治疗脑水肿疗效及安全性的 Meta 分析[J]. 中国中医急症, 2019, 28(2): 248 - 252.

[6] 刘丰年. 五苓散加味治疗颅脑损伤脑水肿的临床观察[J]. 内蒙古中医药, 2014, 33(12): 33 - 34.

[7] 田方泽, 宋文婷, 姚明江, 等. 神经血管单元在缺血性脑水肿中作用机制和中药对其治疗的研究进展[J]. 中国药理学通报, 2020, 36(6): 759 - 762.

[8] 李燕华, 韦俊杰, 周礼圆, 等. 抑制 MMP-9 表达与大鼠氧糖剥夺后星形胶质细胞 AQP4 的表达变化[J]. 中国老年学杂志, 2020, 40(13): 2839 - 2842.

[9] BADAUT J, ASHWAL S, ADAMI A, *et al*. Brain water mobility decreases after astrocytic aquaporin-4 inhibition using RNA interference[J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2011, 31(3): 819 - 831.

[10] 孙彩霞, 杜肖, 曹晓强, 等. 五苓散同方汤剂缺失成分对大鼠肾脏 AQPs 的影响[J]. 现代中药研究与实践, 2019, 33(3): 20 - 23.

[11] YANG ZH, WANG KKW. Glial fibrillary acidic protein: from intermediate filament assembly and gliosis to neurobiomarker[J]. *Trends Neurosci*, 2015, 38(6): 364 - 374.

[12] CLÉMENT T, RODRIGUEZ-GRANDE B, BADAUT J. Aquaporins in brain edema[J]. *J Neurosci Res*, 2020, 98(1): 9 - 18.

[13] YANG M, GAO F, LIU H, *et al*. Hyperosmotic induction of aquaporin expression in rat astrocytes through a different MAPK pathway[J]. *J Cell Biochem*, 2013, 114(1): 111 - 119.

[14] BADAUT J, FUKUDA AM, JULLIENNE A, *et al*. Aquaporin and brain diseases[J]. *Biochim et Biophys Acta BBA-Gen Subj*, 2014, 1840(5): 1554 - 1565.

[15] 倪文娟, 俞松林, 张莉华, 等. 茯苓三萜类成分利水作用的虚拟筛选[J]. 中国药业, 2019, 28(11): 40 - 43.

编辑:刘卓越/接受日期:2020 - 11 - 09