doi:10.13407/j.cnki.jpp.1672-108X.2022.11.002

· 论著 ·

Chemerin/ChemR23 通过诱导未成熟的树突状细胞参与呼吸道合胞病毒感染的免疫调节

马彩霞[1],梁凤[2],陆爱珍[3],金婷婷[3],张明智[3](1.复旦大学附属中山医院青浦分院,上海 201700;2.厦门市儿童医院,福建厦门 361006;3.复旦大学附属儿科医院,上海 201102)

[摘要]**目的**:探讨 Chemerin/ChemR23 通过作用于树突状细胞(DCs)对呼吸道合胞病毒(RSV)肺炎免疫应答的调节作用。**方法**:纳入普通 RSV 肺炎患儿 46 例,对照组外科无肺部症状的手术患儿 19 例。获取外周血分离培养树突状细胞,两组患儿均使用磷酸盐缓冲液(PBS)和 Chemerin 刺激树突状细胞至 48 h,分别检测树突状细胞 ChemR23、CD80 和 CD86 的表达。**结果**:(1)外周血分离出的树突状细胞,培养第 7 天,表面出现毛刺样凸起及典型的树突状细胞形态改变。培养第 15 天,细胞表面毛刺明显增多并呈聚集样改变。培养第 7 天的悬浮细胞 ChemR23、CD80、CD86 均表达阳性。(2)RSV 肺炎患儿外周血 DCs 经 Chemerin 刺激 24 h 和 48 h 后 ChemR23 阳性表达显著高于 PBS 组(29.3%±6.5% *vs* 24.8%±5.8%,25.2%±8.3% *vs* 21.0%±8.3%,*P* 均<0.01);对照组中,DCs 经 Chemerin 刺激 24 h 和 48 h 后 ChemR23 阳性表达率与 PBS 组比较差异均无统计学意义。(3)RSV 肺炎组中,DCs 经 Chemerin 刺激 24 h 和 48 h 后 CD80 阳性表达率显著低于 PBS 组(28.1%±6.0% *vs* 33.4%±7.4%,24.0%±8.7% *vs* 30.8%±9.8%,*P* 均<0.01)。对照组中,DCs 经 Chemerin 刺激 24 h 后 CD80 阳性表达率与 PBS 组比较差异无统计学意义。但 DCs 经 Chemerin 刺激 48 h 后,CD80 阳性率(29.2%±7.4%)显著低于 PBS 组(35.4%±7.6%,*P*<0.01)。(4)RSV 肺炎组中,DCs 经 Chemerin 刺激 24 h 和 48 h 后 CD86 阳性率显著低于 PBS 组(32.9%±6.4% *vs* 36.4%±7.7%,26.6%±10.9% *vs* 30.6%±10.8%,*P* 均<0.01)。DCs 经 Chemerin 刺激 24 h 后 CD86 阳性表达率与 PBS 组比较差异无统计学意义。但 DCs 经 Chemerin 刺激 48 h 后,CD86 阳性率(34.1%±8.2%)则显著低于 PBS 组(40.9%±8.8%,*P*<0.01)。**结论**:早期普通 RSV 肺炎中,Chemerin/ChemR23 可能通过下调共刺激分子 CD80 和 CD86 的表达,特异诱导树突状细胞不成熟,从而与抗炎和后续哮喘发生相关。

[关键词]Chemerin/ChemR23;树突状细胞;呼吸道合胞病毒;免疫
[中图分类号]R725.6 [文献标识码]A [文章编号]1672-108X(2022)11-0005-04

Participation of Chemerin/ChemR23 in Immune Regulation of Respiratory Syncytial Virus Infection Through Induction of Immature Dendritic Cells

Ma Caixia[1], Liang Feng[2], Lu Aizhen[3], Jin Tingting[3], Zhang Mingzhi[3](1. *Qingpu Branch of Zhongshan Hospital, Fudan University, Shanghai* 201700, *China*; 2. *Xiamen Children's Hospital, Fujian Xiamen* 361006, China; 3. *Children's Hospital of Fudan University, Shanghai* 201102, *China*)

[**Abstract**]**Objective**: To probe into the regulation of Chemerin/ChemR23 on immune response to respiratory syncytial virus (RSV) pneumonia through its action on dendritic cells (DCs). **Methods**: A total of 46 children with common RSV pneumonia and 19 children without pulmonary symptoms in surgery in the control group were enrolled. Peripheral blood was obtained for isolation and culture of dendritic cells. Both groups were stimulated with phosphate buffer solution (PBS) and Chemerin for 48 h, and the expressions of ChemR23, CD80 and CD86 in dendritic cells were respectively detected. **Results**: (1) Dendritic cells isolated from peripheral blood showed burr-like protrusions and typical morphological changes on the surface on the 7th d of culture. On the 15th d of culture, the burrs on the cell surface increased significantly and showed aggregated changes. ChemR23, CD80 and CD86 were all positive in suspension cells on the 7th d of culture. (2) The positive expression of ChemR23 in DCs of children with RSV pneumonia after Chemerin stimulation for 24 h and 48 h was significantly higher than that in PBS group (29.3%±6.5% *vs* 24.8% ±5.8%, 25.2%±8.3% *vs* 21.0%±8.3%, *P*<0.01). In the control group, the difference of ChemR23 positive expression rate in DCs after Chemerin stimulation for 24 h and 48 h was not statistically significant compared with the PBS group. (3) In the RSV pneumonia group, the positive expression rate of CD80 after Chemerin stimulation for 24 h and 48 h was significantly lower than that of the PBS group (28.1%±6.0% *vs* 33.4%±7.4%, 24.0%±8.7% *vs* 30.8%±9.8%, *P*<0.01). In the control group, the positive expression rate of CD80 after Chemerin stimulation for 24 h was not significantly different from the PBS group. Yet after DCs were stimulated by Chemerin for 48 h, the positive rate of CD80 (29.2%±7.4%) was significantly lower than that of the PBS group (35.4%±7.6%, *P*<0.01). (4) In the RSV pneumonia group, the positive rate of CD86 in DCs after Chemerin stimulation for 24 h and 48 h was significantly lower than that of the PBS group (32.9%±6.4% *vs* 36.4%±7.7%, 26.6%±10.9% *vs* 30.6%±10.8%, *P*<0.01). There was no significant difference in the positive expression

作者简介:马彩霞(1971.06-),女,大学本科,主任医师,主要从事儿童呼吸系统疾病临床工作,E-mail:maxiaoxiao710717@sina.com。
梁凤(1992.10-),女,大学本科,住院医师,主要从事儿童感染性疾病研究,E-mail:479292516@qq.com。
马彩霞、梁凤为并列第一作者。
通讯作者:张明智(1971.11-),女,主任医师,主要从事儿童呼吸系统疾病研究,E-mail:zhangmingzhi8@hotmail.com。

rate of CD86 between DCs stimulated by Chemerin after 24 h and PBS group. However, the positive expression rate of CD80 (34.1%±8.2%) in DCs after Chemerin stimulation for 48 h was significantly lower than that of PBS group (40.9%±8.8%, $P<0.01$). **Conclusion**: In early common RSV pneumonia, Chemerin/ChemR23 may specifically induce immature DCs by down-regulating the expression of costimulatory molecules CD80 and CD86, which may be associated with anti-inflammatory and subsequent asthma.

[**Keywords**] Chemerin/ChemR23; dendritic cells; respiratory syncytial virus; immunity

呼吸道合胞病毒(RSV)肺炎是严重危害 2 岁以下幼儿健康的常见病,RSV 在 2 岁以下幼儿中感染率达 92.5%~100%,其中 40%~45%的儿童需要住院治疗,1%~2%的患儿会引起呼吸衰竭[1-2]。机体自身免疫反应决定着 RSV 感染的发展方向,而与病毒负荷量关系不密切[3]。肺部树突状细胞(dendritic cells,DCs)是肺部免疫的启动者和维护者,它是局部免疫的重要调节点,所以肺部 DCs 的功能状态对 RSV 感染的发展起重要作用[3]。近年来,Chemerin/ChemR23 趋化蛋白受体系统对 DCs 的作用开始引起学者关注[4-5]。肺组织中高表达 Chemerin[6]、ChemR23 在单核细胞衍生的未成熟的 DC 和巨噬细胞特异表达[7]。Chemerin 通过与 ChemR23 特异性识别并结合,在体外特异趋化未成熟 DCs 和巨噬细胞,参与炎症免疫应答的调节。本研究通过检测 Chemerin 对 RSV 肺炎患儿外周血树突状细胞 Chemr23、CD80 及 CD86 表达的影响,探讨 Chemerin/ChemR23 通过作用于 DCs 对 RSV 肺炎免疫应答的调节作用。

1　资料与方法

1.1　一般资料

选取 2014 年 10 月至 2019 年 4 月在复旦大学附属中山医院青浦分院及复旦大学附属儿科医院住院的<2 岁 RSV 肺炎患儿为研究对象。RSV 肺炎组纳入标准:(1)年龄<2 岁;(2)符合《诸福棠实用儿科学》(第七版)肺炎诊断标准;(3)直接免疫荧光法检测鼻咽部灌洗液 RSV 抗原阳性且无其他病原合并感染。排除标准:(1)入院前应用类固醇激素及免疫球蛋白;(2)先天性心脏病、慢性肺部疾病、支气管发育不良、早产儿等基础疾病;(3)外周血白细胞计数>15×10^9/L,中性粒细胞百分比>70%;(4)合并有其他病原感染。纳入研究的 RSV 肺炎患儿共 46 例,外科无肺部症状的手术患儿 19 例作为对照组。本研究经复旦大学附属中山医院青浦分院及复旦大学附属儿科医院医学伦理委员会批准,家长签署知情同意书。

1.2　DCs 的分离和培养

两组患儿在入院第 1 天即采集外周肝素抗凝血 5 mL,采用淋巴细胞分离液(Ficoll-Paque Plus,GE Healthcare,Uppsala,Sweden)分离 DCs,分离所得 DCs 于 5%CO_2、37 ℃细胞培养箱中培养 3 h。轻轻洗去非粘附细胞,重新加入含有 500 U/mL 粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF,Peprotech,USA)和 1 000 U/mL 白介素-4(IL-4,Peprotech,USA)RPMI 1640 培养液。隔日半量换液,共培养至第 15 天。取不同培养天数的 DCs,放置于培养皿中,用倒置显微镜观察树突状细胞形态变化。

1.3　DCs 上 ChemR23、CD80、CD86 的表达

DC 培养第 7 天,取 2×10^5 个细胞于 6 孔板中培养,加入 3 nmol/L Chemerin(Peprotech,USA)共同培养。对照组加入等量的磷酸盐缓冲液(PBS),共培养 24 h 和 48 h。所取细胞用流式细胞术检测各组 DCs 经刺激 24 h 和 48 h 后 ChemR23、CD80、CD86 的表达变化。离心收集 DCs,PBS 清洗 1 次,加入抗人 CD80-FITC(eBioscience),抗人 CD86-PE(eBioscience)和抗人 ChermR23 Percp-(Santa Cruze)抗体孵育 30 min,采用流式细胞仪(FACScalibur, BD Biosciences,USA)检测。

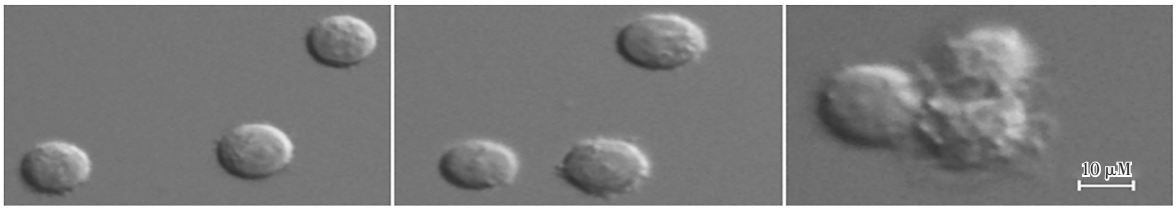
1.4　统计学方法

应用 SPSS 25.0 软件进行统计分析。计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,正态分布资料采用单因素方差分析进行多组间比较,进一步采用 LSD-t 检验进行两两比较;非正态分布资料采用 Kruskal-Wallis H 秩和检验进行多组间比较。采用 Pearson 相关分析进行两变量相关性分析。计数资料采用 χ^2 检验。$P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2　结果

2.1　外周血培养 DCs 的形态变化和表型鉴定

从外周血获取的人外周血单核细胞(PBMC)体外培养 2 h 后,获得贴壁细胞。培养 24 h 出现细胞聚集现象,培养第 3 天细胞开始分散,仍为圆形细胞。培养第 7 天,相差显微镜下观察到细胞形态不规则,表面出现毛刺样凸起,出现典型的树突状细胞形态改变。培养第 15 天,细胞表面毛刺明显增多并呈聚集样改变(图 1)。培养第 7 天的悬浮细胞经流式细胞术(FCM)检测,发现 ChemR23、CD80、CD86 均表达阳性(图 2)。



第 3 天　　第 7 天　　第 15 天

图 1　DCs 分离培养

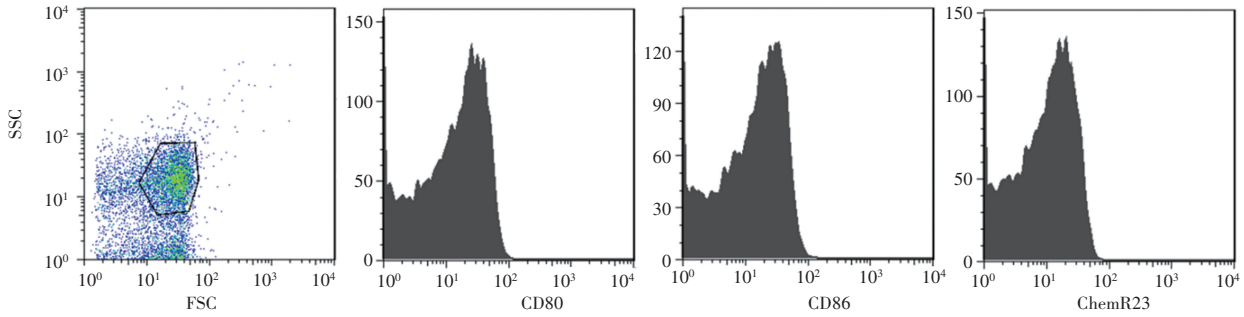


图 2 流式细胞仪检测 CD80、CD86 和 ChemR23

2.2 Chemerin 刺激后 DCs 上 ChemR23、CD80、CD86 表达

RSV 肺炎患儿外周血 DCs 经 Chemerin 刺激 24 h 后 ChemR23 阳性表达率为 29.3%±6.5%显著高于 PBS 组的 24.8%±5.8%(P<0.01);刺激 48 h 后 ChemR23 阳性表达率为 25.2%±8.3%,显著高于 PBS 组的 21.0%±8.3%(P<0.01)。对照组中,DCs 经 Chemerin 刺激 24 h、48 h 后 ChemR23 阳性表达率与 PBS 组比较差异均无统计学意义。RSV 肺炎组中,DCs 经 Chemerin 刺激 24 h 后 CD80 阳性表达率为 28.1%±6.0%,显著低于 PBS 组的 33.4%±7.4%(P<0.01);DCs 经 Chemerin 刺激 48 h 后其 CD80 阳性表达率为 24.0%±8.7%,显著低于 PBS 组的 30.8%±9.8%(P<0.01)。对照组中,DCs 经 Chemerin 刺激 24 h 后 CD80 阳性表达率与 PBS 刺激组比较差异无统计学意义。但 DCs 经 Chemerin 刺激 48 h 后,CD80 阳性率(29.2%±7.4%)显著低于 PBS 组(35.4%±7.6%)(P<0.01)。RSV 肺炎组中,DCs 经 Chemerin 刺激 24 h CD86 阳性率为 32.9%±6.4%及 48 h 后 CD86 阳性率为 26.6%±10.9%,均显著低 PBS 组的 36.4%±7.7%及 30.6%±10.8%(P<0.01)。对照组中 CD86 的表达与 CD80 类似。DCs 经 Chemerin 刺激 24 h 后 CD86 阳性表达率与 PBS 组比较差异无统计学意义。但 DCs 经 Chemerin 刺激 48 h 后,CD86 阳性率(34.1%±8.2%)则显著低于 PBS 组(40.9%±8.8%)(P<0.01)。见表 1。

表 1 DCs 中 ChemR23、CD80、CD86 表达

组别	例数	处理方式	ChemR23 阳性率/%		CD80 阳性率/%		CD86 阳性率/%	
			24 h	48 h	24 h	48 h	24 h	48 h
对照组	19	PBS	28.5±10.2	34.3±7.2	35.8±9.8	35.4±7.6	40.2±9.8	40.9±8.8
		Chemerin	30.6±8.5	30.9±7.2	31.2±8.4	29.2±7.4#	36.3±8.8	34.1±8.2#
RSV 组	46	PBS	24.8±5.8	21.0±8.3	33.4±7.4	30.8±9.8	36.4±7.7	30.6±10.8
		Chemerin	29.3±6.5#	25.2±8.3#	28.1±6.0#	24.0±8.7#	32.9±6.4#	26.6±10.9#

注:#与 PBS 比较,P<0.01

3 讨论

DCs 是体内最强大的抗原呈递细胞,呈递抗原给 T 细胞,激发初始 T 细胞反应,分泌一系列细胞因子和化学因子,进一步参与机体免疫调节,在感染性和免疫相关性疾病中发挥重要作用。目前常用的 DCs 培养方法是通过外周血来源的 DCs 进行培养[8-9]。DCs 的培养通常包括启动培养和分化培养 2 个阶段[10]:第 1 阶段应用 GM-CSF、IL-4 诱导出非成熟 DCs,其中重组 GM-GSF(rhGM-CSF)是 DCs 生成所必需,IL-4 的作用主要是抑制 DCs 前体细胞向巨噬细胞和粒细胞分化的作用。第 2 阶段加入肿瘤坏死因子(TNF)-α,TNF-α 可促进 DCs 的成熟。本研究采用密度梯度离心法从人外周血获取了 PBMC,加入 GM-CSF 和 IL-4 诱导培养 DCs,使用相差显微镜动态观察了 DCs 形态变化,观察到所培养的 DCs 由起初的细胞聚集,进一步悬浮成团,再到分散状态;DC 细胞表面由毛茸状到不规则的毛刺状突起。这与文献报道的典型 DCs 的形态一致[8-9]。

CD80 和 CD86 是 DCs 的共刺激分子,在 DCs 成熟的过程中,CD80 和 CD86 的表达不断增高[11]。本研究发现外周血 PBMC 培养至第 7 天,CD80 和 CD86 均有一定表达,但荧光强度偏低;培养第 7 天的 DCs 也表达 ChemR23,ChemR23 是未成熟的 DCs 的表面标志[7]。表面分子的研究结果提示,尽管培养第 7 天的 DCs 开始表达共刺激分子 CD80 和 CD86,具有一定的抗原呈递能力,但仍处于未成熟状态。

本研究结果发现,对照组患儿外周血 DCs,Chemerin 刺激 24 h 和 48 h,ChemR23 的表达与 PBS 组比较差异无统计学意义。而在 RSV 肺炎患儿中,与 PBS 组相比,DCs 经 Chemerin 刺激 24 h 和 48 h 后 ChemR23 表达均高于 PBS 组。提示 RSV 患儿的外周血 DCs 较正常患儿外周血 DCs 对 Chemerin 刺激具有高反应性,倾向高表达 ChemR23。ChemR23 高表达可趋化未成熟 DCs。本研究还发现,对照组患儿外周血 DCs,Chemerin 刺激 24 h,CD80 和 CD86 的表达与 PBS 组比较差异无统计学意义;而刺激 48 h 后,CD80 和 CD86 表达均显著降低。而在 RSV 肺炎患儿中,与 PBS 组相比,DCs 经 Chemerin 刺激 24 h 和 48 h 后 CD80 和 CD86 表达均显著低于 PBS 组。

表明在正常状态下,随着刺激时间的延长,Chemerin 可刺激正常 DCs 低表达 CD80 和 CD86。对 RSV 感染后 DCs,Chemerin 能显著抑制其表达 CD80 和 CD86,诱导其分化成未成熟 DCs。

Chemerin 是近年发现的趋化因子,Chemerin/ChemR23 系统对炎症有双相调节作用,一方面可趋化未成熟 DCs、巨噬细胞、自然杀伤细胞等到达炎症部位,具有促炎效应;另一方面,Chemerin 同时还具有抗炎特性,下调促炎性因子如 TNF-α、IL-6、IL-1β 的表达,上调抗炎性因子 IL-10、TGF-β 的表达[12-14]。本课题组前期的研究发现,重症 RSV 肺炎组 Chemerin/ChemR23 与肺部炎症的严重程度相关[15]。而在本研究中,普通 RSV 感染中 Chemerin/ChemR23 体外特异趋化未成熟的 DCs,低表达共刺激分子 CD80 和 CD86,可能具有一定的抗炎作用。动物研究也发现,非重症病毒性肺炎小鼠模型中,Chemerin/ChemR23 系统有减轻肺部炎症因子浸润的作用,在病毒性肺炎中发挥抗炎效应[16]。

大量文献报道,生后早期 RSV 感染可能与之后的反复喘息发作甚至哮喘密切相关[17-20],而哮喘患者外周血中发现未成熟的 DCs 比例和数量增多[21-22],结合本研究结果,在 Chemerin/ChemR23 通过诱导普通 RSV 肺炎患儿的 DCs 成未成熟 DCs,使得免疫反应倾向于 Th2 方向发展,可能与未来哮喘发生相关。

综上所述,早期普通 RSV 肺炎中,Chemerin/ChemR23 可能通过下调共刺激分子 CD80 和 CD86 的表达,特异诱导 DCs 不成熟,从而与抗炎和后续哮喘发生相关。

参考文献:

[1] HENRICKSON K J, HOOVER S, KEHL K S, et al. National disease burden of respiratory viruses detected in children by polymerase chain reaction [J]. J Pediatr Infect Dis, 2004, 23(1 Suppl): S11-S18.

[2] 沈军, 朱启镕, 俞惠, 等. 急性下呼吸道感染住院儿童病原及临床流行病学分析[J]. 中华传染病杂志, 2009, 27(11): 668-672.

[3] MORRIS S, SWANSON M S, LIEBERMAN A, et al. Autophagy-mediated dendritic cell activation is essential for innate cytokine production and APC function with respiratory syncytial virus responses [J]. J Immunol, 2011, 187(8): 3953-3961.

[4] GERL V, LISCHKA A, PANNE D, et al. Blood dendritic cells in systemic lupus erythematosus exhibit altered activation state and chemokine receptor function [J]. Ann Rheum Dis, 2010, 69(7): 1370-1377.

[5] PAROLINI S, SANTORO A, MARCENARO E, et al. The role of chemerin in the colocalization of NK and dendritic cell subsets into inflamed tissues [J]. Blood, 2007, 109(9): 3625-3632.

[6] ROH S G, SONG S H, CHOI K C, et al. Chemerin--a new adipokine that modulates adipogenesis via its own receptor [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2007, 362(4): 1013-1018.

[7] SAMSON M, EDINGER A L, STORDEUR P, et al. ChemR23, a putative chemoattractant receptor, is expressed in monocyte-derived dendritic cells and macrophages and is a coreceptor for SIV and some primary HIV-1 strains [J]. Eur J Immunol, 1998, 28(5): 1689-1700.

[8] 蔡学敏, 朱向情, 刘凌, 等. 人外周血树突状细胞的诱导、鉴定及活性测定[J/OL]. 中华细胞与干细胞杂志(电子版), 2012, 2(4): 231-236.

[9] 颜汝平, 周海滨, 李翀, 等. 人外周血树突状细胞体外诱导培养及表型鉴定[J]. 昆明医学院学报, 2010, 31(11): 21-24.

[10] BERTHIER R, MARTINON-EGO C, LAHARIE A M, et al. A two-step culture method starting with early growth factors permits enhanced production of functional dendritic cells from murine splenocytes [J]. J Immunol Methods, 2000, 239(1-2): 95-107.

[11] 陈蕴颖, 步宏. 树突状细胞的表面标志及其免疫学意义[J]. 生物医学工程学杂志, 1998(4): 89-93.

[12] GERL V, LISCHKA A, PANNE D, et al. Blood dendritic cells in systemic lupus erythematosus exhibit altered activation state and chemokine receptor function [J]. Ann Rheum Dis, 2010, 69(7): 1370-1377.

[13] PAROLINI S, SANTORO A, MARCENARO E, et al. The role of chemerin in the colocalization of NK and dendritic cell subsets into inflamed tissues [J]. Blood, 2007, 109(9): 3625-3632.

[14] CASH J L, HART R, RUSS A, et al. Synthetic chemerin-derived peptides suppress inflammation through ChemR23 [J]. J Exp Med, 2008, 205(4): 767-775.

[15] 金婷婷, 张明智, 王立波, 等. Chemerin 在婴幼儿呼吸道合胞病毒肺炎中的调节作用[J]. 临床儿科杂志, 2015, 33(2): 113-116.

[16] BONDUE B, VOSTERS O, DE NADAI P, et al. ChemR23 dampens lung inflammation and enhances anti-viral immunity in a mouse model of acute viral pneumonia [J]. PLoS Pathog, 2011, 7(11): e1002358.

[17] VALKONEN H, WARIS M, RUOHOLA A, et al. Recurrent wheezing after respiratory syncytial virus or non-respiratory syncytial virus bronchiolitis in infancy: a 3-year follow-up [J]. Allergy, 2009, 64(9): 1359-1365.

[18] RUOTSALAINEN M, HYVÄRINEN M K, PIIPPO-SAVOLAINEN E, et al. Adolescent asthma after rhinovirus and respiratory syncytial virus bronchiolitis [J]. Pediatr Pulmonol, 2013, 48(7): 633-639.

[19] KUSEL M M, DE KLERK N H, KEBADZE T, et al. Early-life respiratory viral infections, atopic sensitization, and risk of subsequent development of persistent asthma [J]. J Allergy Clin Immunol, 2007, 119(5): 1105-1110.

[20] SIGURS N, ALJASSIM F, KJELLMAN B, et al. Asthma and allergy patterns over 18 years after severe RSV bronchiolitis in the first year of life [J]. Thorax, 2010, 65(12): 1045-1052.

[21] 刘晓帆, 耿爽, 胡轶, 等. 咳嗽变异性哮喘与典型支气管哮喘患者外周血树突状细胞的变化[J]. 暨南大学学报(自然科学与医学版), 2017, 38(1): 63-68.

[22] MARIANI F, RONCUCCI L. Chemerin/chemR23 axis in inflammation onset and resolution [J]. Inflamm Res, 64(2): 85-95.

(编辑:曾敏莉)

(收稿日期:2021-03-09 修回日期:2021-06-09)