

脱细胞人羊膜支架材料对羊膜源性 干细胞增殖作用的影响^{*}

渠亚超¹ 殷继明² 任锋² 樱川宣男³ 加茂功³ 鲍旭丽¹ 陈德喜² 李宁² 朴正福²

(1.首都医科大学附属北京佑安医院肿瘤内科,北京 100069;

2.北京市肝病研究所,北京 100069;3.日本北里大学再生医疗部门,东京 108-8641)

【摘要】 目的 研究脱细胞人羊膜支架材料的制备及其对羊膜源性干细胞增殖作用的影响。方法 利用 38~40 周孕妇剖宫产术后的羊膜,洗净后用物理及酶消化的方法清除羊膜细胞成分,得到脱细胞人羊膜支架材料,并制备了不同浓度的包被培养皿。剥离剖宫产后的羊膜利用流式细胞分选技术从中分离干细胞,并在包被培养皿上探讨细胞增殖活性,与其他生物材料包被培养皿做比较。结果 羊膜源性干细胞在脱细胞人羊膜支架材料的包被培养皿上增殖速度明显增强,且与包被浓度明显相关。与常用的支架材料相比其对干细胞增殖效果更强,差异显著。结论 脱细胞人羊膜支架材料有望成为干细胞研究与再生医疗领域中的新型生物材料。

【关键词】 羊膜;脱细胞人羊膜支架;羊膜源性干细胞;生物材料;再生医学

【中图分类号】 Q813.2 **【文献标志码】** A **DOI:**10. 3969/j. issn. 1672-3511. 2022. 05. 003

Effect of human acellular amniotic membrane scaffold material on the proliferation of amniotic membrane-derived stem cells

QU Yachao¹, YIN Jiming², REN Feng², NORIO Sakuragawa³, ISAO Kamo³, BAO Xuli¹,
CHEN Dexi², LI Ning², PIAO Zhengfu²

(1. Department of Oncology, Beijing You'an Hospital, Capital Medical University, Beijing 100069, China;

2. Beijing Institute of Hepatology, Beijing 100069, China;

3. Department of Regenerative Medicine, Kitasato University, Tokyo 108-8641, Japan)

【Abstract】 **Objective** Preparation of human acellular amniotic membrane scaffold and its effect on the proliferation of amniotic membrane-derived stem cells. **Methods** The amniotic membrane of pregnant women after caesarean section at 38-40 weeks was used. The amniotic membrane cell components were removed by physical and enzymatic digestion after washing, and the acellular amniotic membrane scaffold material was obtained, and coated culture dishes of different concentrations were prepared. The amniotic membrane after the caesarean section was stripped and the stem cells were separated by flow cytometry. The amniotic membrane-derived stem cells were cultured on petri dish coated with acellular amniotic membrane scaffold and the cell proliferation activity was analyzed by Cell Counting Kit-8 (CCK-8), and compared with other biological materials coated petri dishes. **Results** The proliferation rate of stem cells on a culture dish coated with acellular amniotic membrane scaffold was significantly increased, which was significantly related to the coating concentration. Compared with commonly used scaffold materials, it has a stronger effect on stem cell proliferation, and the difference is significant. **Conclusion** Human acellular amniotic membrane scaffold material is expected to become a new type of biomaterial in the field of stem cell research and regenerative medicine.

【Key words】 Amniotic membrane; Acellular amniotic membrane scaffold; Amniotic membrane-derived stem cells; Biomaterials; Regenerative medicine

基金项目:北京市肝病研究所所内基金(2018-4-8)

通信作者:朴正福, E-mail: zfpiao88@cemu.edu.cn

引用本文:渠亚超,殷继明,任锋,等. 脱细胞人羊膜支架材料对羊膜源性干细胞增殖作用的影响[J]. 西部医学, 2022, 34(5):639-643. DOI:10.

3969/j. issn. 1672-3511. 2022. 05. 003

人羊膜位于胎盘的最内层,为厚度 20~500 μm 的半透明膜^[1-2],拥有优越的细胞外基质成分,被认为是天然支架中最好的材料而广泛运用于组织工程学中^[3-4]。人羊膜作为细胞载体的支架材料具有很多优点,如细胞三维结构培养、生物相容性好、可吸收性和无毒性反应等^[5],已被广泛应用于各部位损伤修复,如角膜移植、皮肤缺损、软骨损伤后的修复及外周神经再生等领域,并获得良好的治疗效果^[6-13]。脱细胞人羊膜支架是用物理、化学、以及酶消化来破坏细胞膜和细胞之间的化学键,释放出细胞内容物,以制成具有活性物质的细胞外基质生物材料。脱细胞人羊膜支架具有生物相容性好、低免疫原性等特点,富含多种细胞功能调节因子、胶原蛋白等为细胞生长提供适宜微环境^[14]。羊膜细胞外基质作为一种生物材料在组织工程中的应用越来越受到重视。羊膜干细胞具有强大的更新和分化能力,李文武等^[15]证实干细胞移植用于肝衰竭中能提高肝功能水平、减轻肝脏局部炎症细胞聚集,从而缓解肝脏组织病理损伤。Shi 等^[16]评估了干细胞治疗 HBV 感染相关的慢加急性肝衰竭患者的安全性和有效性,发现干细胞静脉输注后可增加患者血清白蛋白和胆碱酯酶水平、凝血酶原活性以及血小板计数,同时显著降低血清总胆红素和转氨酶水平,改善肝功能,减少终末期肝病模型评分,从而提高患者生存率。本研究从胎盘中分离完整的羊膜,用物理化学方法去除细胞成分制备成细胞外基质液,并用不同浓度包被培养皿,在其上培养羊膜源性干细胞,并对脱细胞人羊膜支架对羊膜来源干细胞的生长增殖作用进行探讨。

1 材料与方法

1.1 材料 羊膜源性干细胞(hAMC-SP)分选及分离培养:取 38~40 周孕妇剖宫产术后羊膜,获取胎盘事先得到知情同意。羊膜以 0.125% 胰酶(含 1.3 mM EDTA)37°C 下消化后清除人羊膜上皮细胞(human amnion epithelial cells, hAECs)。以 0.01% 胶原酶及 DNA 酶混合液 37°C 继续消化 1 h,同时置振荡器振荡。离心后获得的细胞即 hAMCs。准备 2 份 hAMCs($10^6/\text{mL}$)悬浮于 DMEM(含 2% FBS、10 mM HEPES)中,用 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Hoechst 33342 (Sigma)进行细胞核染色 120 min。为遮断染料排除泵,其中 1 份加 50 μM verapamil(维拉帕米),作为对照。染色结束后 4°C 下离心(1500 rpm, 5 min)。Hanks' 平衡盐溶液(含 2% FBS、10 mM HEPES)重悬细胞至 $(2\sim 4)\times 10^6/\text{mL}$,然后加入 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ PI(Sigma)。装备 360 nm 紫外激光器的 EPICS ALTRA 流式细胞仪(Beckman Coulter, Fullerton, CA)用于细胞筛选。

Hoechst 33342 及 PI 首先受紫外激发。其荧光发射分别利用 450/20 nm 带通滤光片(Hoechst 蓝色荧光信号)和 675 nm 长带滤光片(Hoechst 红色荧光信号)进行检测。从死细胞发射出的 PI 荧光信号用带通滤光片进行测定。610 nm 短通型二色分光镜用于分离这些反射波长。Hoechst 的蓝、红色荧光以线性标度显示。在这条线上显示 Hoechst 荧光的为 SP 侧群细胞,加 verapamil 的对照组在此区域显示弱或消失 Hoechst 荧光。SP 区域分选出的 hAMC-SP 细胞,用 DMEM/F-12 (1:1) 培养皿(含 10% FBS, 10 ng/mL 人白细胞抑制因子(LIF, CHEMICON)、10 ng/mL 表皮生长因子(PeproTech)、10 ng/mL β 成纤维生长因子(bFGF, Pepro Tech)、0.2 mM 2-巯基乙醇(Sigma)和脱细胞羊膜支架包被的培养皿,置于 37°C、5% CO_2 饱和湿度的孵箱内培养。羊膜液制备:得到患者的知情同意前提下,获得 38~40 周孕妇剖宫产术后的羊膜。用 PBS 反复清洗后把羊膜切成 1~2 cm,加入 0.02% EDTA 溶液后反复震荡。离心后弃上清液,加入 0.25 M 醋酸溶液后在 90°C 水中缓慢摇动,直至完全溶解。经过多次离心后,上清放入至透析袋,并在水中反复透析。蛋白定量后低温保存。脱细胞人羊膜支架包被培养皿制备:选择 96 孔板,在里面铺平羊膜液,以 0.5~1.5 mg 蛋白量/ cm^2 面积铺培养板(根据 280/260 OD 值决定)。根据羊膜液浓度不同设置低浓度组、中浓度组及高浓度组。包被培养皿进行紫外线照射(离培养皿 15 cm, 15 w UV 强度照射 15 min),并保存在冷藏环境下(保存时间不超过一年)。用类似的方法制备 0.9% 生理盐水包被培养皿作为对照组、人细胞外基质(HEM)(BD Biosciences, USA)培养皿及胶原蛋白 I(足键, Iwaki, Japan)培养皿。蛋白质浓度利用 Quick Start Bradford Dye Reagent (Bio Rad, USA)检测。

1.2 羊膜干细胞增殖活性检测 羊膜源性干细胞(hAMC-SP)3500~4500 个/ cm^2 铺平 24 孔培养皿,对照组及每个实验组均设置 3 个重复平行孔($n=3$),且做了 3 次重复同样实验。置于 37°C、5% CO_2 , 饱和湿度的孵箱内培养。不同的时间用 EDTA-胰酶溶液进行消化,并 PBS 洗涤后用于测定。羊膜干细胞增殖活性用 CCK-8 细胞计数试剂盒(Dojindo, Japan)进行检测。

1.3 统计学分析 采用 SPSS 11.0 统计软件进行分析,两样本间比较采用校正 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 hAMC-SP 培养情况 羊膜干细胞在脱细胞人羊膜支架包被培养皿上在 37°C、5% CO_2 下进行培养 2~

3 天后细胞粘附在培养皿底面, 更换培养液, 以清除未贴壁细胞。显微镜下观察其生长情况, 每 3 天换液, 细胞长满后用胶原酶-EDTA 消化进行传代培养。hAMC-SP 大部分 1~3 天内贴壁, 细胞呈现梭性或星性, 此时细胞呈现单个分散或几个细胞克隆。培养一周后细胞增殖速度明显, 发生形态变化, 呈宽大扁平, 细胞成群。

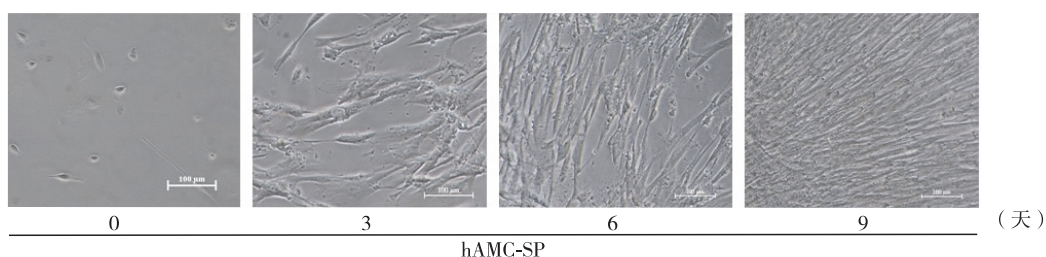


图 1 羊膜干细胞在脱细胞人羊膜支架材料包被培养皿上生长情况 (100×)

Figure 1 Growth of amniotic membrane stem cells on a culture dish coated with acellular amniotic membrane scaffold

2.2 hAMC-SP 在脱细胞人羊膜支架包被培养皿上培养情况 不同浓度(低浓度 0.5 mg/cm^2 、中浓度 1.0 mg/cm^2 、高浓度 1.5 mg/cm^2)的脱细胞人羊膜支架包被培养皿上 hAMC-SP 的生长增殖速度显示不一样, 包被浓度越高细胞生长速度越快, 提示脱细胞人羊膜支架材料对羊膜源性干细胞的增殖具有明确促进作用。培养 0 天时, 各组间无统计学差异 ($P > 0.05$)。培养 4 天时, 对照组与不同浓度组之间细胞增殖速度出现显著性差异 (均 $P < 0.05$), 且细胞增殖速度在低和中浓度组之间、中和高浓度组之间均有显著性差异 ($P = 0.029$ 及 0.022), 提示羊膜支架材料对早期的细胞增殖速度影响明显。培养 8 天时, 对照组与其它三组不同浓度之间仍然差异显著 (均 $P < 0.05$)。低、中浓度组与高浓度组之间有显著性差异 (均 $P < 0.05$)。培养 12 天时, 对照组与低、中及高浓度之间细胞数有显著性差异 (均 $P < 0.05$), 且低浓度组与中、高浓度组之间均有显著性差异 ($P = 0.049$ 及 0.029)。提示随着培养时间进一步延长, 细胞增殖速度仍明显受到羊膜支架材料浓度的影响, 见图 2。

2.3 hAMC-SP 在不同生物材料包被培养皿上培养 把 hAMC-SP 在对照组、胶原蛋白 I 组、脱细胞人羊膜支架及人细胞外基质 (HEM) 等生物材料包被培养皿上进行培养, 以此比较羊膜来源干细胞在不同生物材料包被培养皿的生长情况 (图 3A)。结果脱细胞人羊膜支架材料包被培养皿上干细胞增殖速度与其他三组相比, 差异存在显著性 (均 $P < 0.05$) (图 3B)。胶原蛋白 I 组与 HEM 组之间无显著性差异 ($P = 0.127$)。

免疫细胞化学分析, hAMC-SP 细胞表达 Vimentin、Nestin、Musashi-1 等神经干细胞特异性标记蛋白, 也表达 Flt-1、Integrin β 及 HNF 等肝干细胞分化相关蛋白^[17]。在脱细胞人羊膜支架材料包被培养皿上培养的细胞与其他包被生物材料相比, 粘附快、排列整齐均匀、未贴壁细胞很少、增殖速度明显加快, 见图 1。

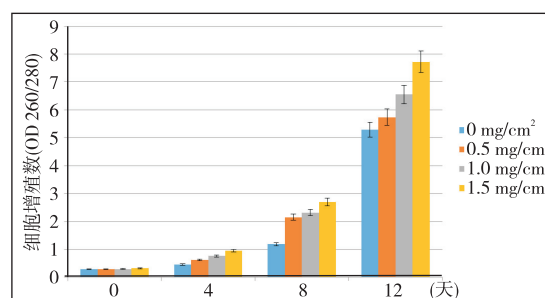


图 2 不同浓度羊膜支架材料包被培养皿上细胞增殖活性分析

Figure 2 Analysis of cell proliferation activity on culture dishes coated with different concentrations of amniotic membrane scaffold materials

注: 培养 4、8、12 天时, 对照组与不同浓度组之间细胞增殖速度出现显著性差异, 不同浓度之间也出现增殖速度的差异。平均增殖细胞数用 OD 值表示 (每次 3 个细胞孔, 重复 3 次实验)

3 讨论

在组织工程领域, 支架材料是不可或缺的环节。理想的提供细胞种植的基质材料应具有以下特点: 无毒性、良好的生物组织相容性、生物可降解性及降解可调节性, 同时不引起机体的免疫排斥反应, 具有可塑性和一定的机械强度以及良好的表面活性等^[18-19]。羊膜的生物学特性是羊膜成为理想供体材料的物质基础。1910 年胎膜第一次被成功地用作皮肤移植的供体材料后^[20], 羊膜作为一种生物材料受到广泛注目。羊膜位于胎盘的最内层, 其光滑, 无血管、神经及淋巴, 无免疫原性。

1980 年 Kari 等^[21]分析了人羊膜上皮细胞在进行原代培养时所产生的细胞外基质的组成, 其成分主要为两种基质蛋白, 即纤维结合蛋白和 III 型溶胶原蛋白, 还有少量的层粘连蛋白 IV 型和 AB 型

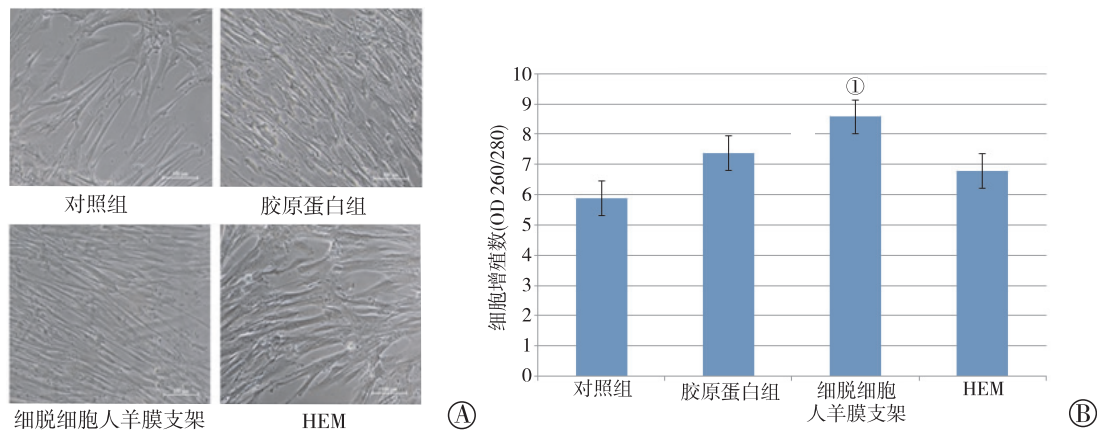


图 3 hAMC-SP 在不同生物材料包被培养皿上培养

Figure 3 Amniotic membrane-derived stem cells were cultured on different biomaterial-coated culture dishes

注: A. 羊膜源性干细胞在不同生物材料包被培养皿上进行培养 8 天结果(100×); B. 各种生物材料包被培养皿中羊膜源性干细胞的培养。培养 8 天后的平均增殖细胞数(OD 值)(每次 3 个细胞孔, 重复 3 次实验)。①P<0.05

基膜胶原。羊膜溶液化后的成份鉴定提示, 加工处理后的羊膜具有结构和功能性的基质特征^[22]。华萍等^[23]发现冻干羊膜或新鲜羊膜均具有良好的组织相容性, 不会引起明显的急性免疫排斥反应, 作为异体移植材料免疫安全性较好。人羊膜支架不仅具有安全性, 同时含有促进细胞增殖的成分。有研究证实人羊膜含有纤维黏连素、IV 型胶原及大量硫酸乙酰肝素蛋白多糖, 以及其它一些蛋白多糖大分子和神经营养因子。Enosawa 等^[24]发现人羊膜上皮细胞不仅表达神经细胞的特异性蛋白, 而且还合成和分泌多种神经营养因子及神经递质。这可能与促进细胞增殖相关。杨继滨等^[25]研究发现人脱细胞羊膜支架能够有效促进人羊膜间充质细胞黏附, 并且未发现排斥反应及毒性。日本学者把羊膜作为一个基质, 在羊膜上进行了胚胎干细胞的培养, 并诱导成神经细胞^[26]。作为肝病大国, 终末性肝病的治疗中干细胞移植越来越受到瞩目, 干细胞的分离和体外培养, 维持它的干性特征的实验室研究具有重要意义。

在前期研究中我们从人羊膜成功分离干细胞, 并对其生物学特性进行了一系列的鉴定, 它表达 Oct-4、Sox-2 及 Rex-1 等干细胞标记物, 但它不表达 CD34、CD45 等造血干细胞标记分子^[18], 具有间充质干细胞表面抗原特征。在本研究中我们成功制备了脱细胞人羊膜支架包被培养皿, 并把羊膜中分离的干细胞在包被培养皿上进行了培养, 以此探讨羊膜支架对干细胞增殖速度的影响。结果提示与未处理过的普通培养皿相比, 羊膜源性干细胞在羊膜支架材料包被的培养皿上增殖率明显增加, 且浓度越高其增殖速度越快, 呈线性正相关性。去除细胞后的羊膜支架材含有

各种类型的胶原纤维、纤维连接蛋白、整合素及层粘连蛋白等分子, 这些成分的存在对细胞的生长提供三维空间结构, 促进各种细胞的粘附, 有利于细胞快速生长。本研究结果也证明了脱细胞人羊膜支架材料对成体干细胞具有促进粘附和增殖作用。羊膜作为廉价的生物材料, 将为细胞的体外培养、胚胎及成体干细胞的生物学特性研究, 以及再生医学的众多领域中发挥重要的作用。

本研究的另一个实验结果表明, 脱细胞羊膜支架与传统的胶原纤维及人细胞外基质材料比较, 具有更明显的促进细胞增殖生长的作用, 提示羊膜支架材料有着更广阔的基础与临床应用研究价值。来自动物的胶原蛋白包被的培养皿等可能含有动物来源的抗原成分, 细胞培养后移植治疗时引起免疫反应, 在生物医学研究中具有一定的局限性和风险因素, 因此再生医学领域中人来源的生物材料具有更重要的意义。细胞外基质除了生物支架作用外, 还对各种干细胞的粘附、分化、发育及移行等表现具有及其深远影响, 其分子作用机制有待进一步摸索和探讨。本实验中对培养后干细胞的活性及功能未进行进一步的检测和分析, 需要下一步继续探讨。

各种组织中提取的干细胞在培养时发现, 与空白对照组相比在某些细胞外基质包被培养皿上干细胞呈现较好的黏附, 增殖生长速度加快、移行等特点, 可以迅速增殖到足够细胞数量以用于移植治疗。但来自动物的胶原蛋白、纤维蛋白等生物材料包被的培养皿等可能含有动物来源的抗原成分, 细胞培养后移植治疗时易引起免疫反应。而脱细胞人羊膜支架材料具有来源广泛、容易制备、易于保存、不涉及伦理问题

及无免疫排斥反应等特点,作为一种特殊的细胞外基质和生物载体,在再生医学研究领域中具有极其广阔的应用前景。

4 结论

脱细胞人羊膜支架材料有望成为干细胞研究与再生医疗领域中的新型生物材料。

【参考文献】

- [1] AMENSAG S, MCFETRIDGE P S. Rolling the human amnion to engineer laminated vascular tissues[J]. *Tissue Eng Part C Methods*, 2012, 18(11): 903-912.
- [2] BUERZLE W, HALLER C M, JABAREEN M, *et al.* Multiaxial mechanical behavior of human fetal membranes and its relationship to microstructure[J]. *Biomech Model Mechanobiol*, 2013, 12(4): 747-762.
- [3] RIAU A K, BEUERMAN R W, LIM L S, *et al.* Preservation, sterilization and de-epithelialization of human amniotic membrane for use in ocular surface reconstruction[J]. *Biomaterials*, 2010, 31(2): 216-225.
- [4] PHILIPS G O, NATHER A. The Scientific Basis of Tissue Transplantation[J]. WORLD SCIENTIFIC, 2001.
- [5] 闫国和. 羊膜基质在组织修复中的应用研究进展[J]. *生物医学工程杂志*, 2002, 19(4): 676-67.
- [6] KHEIRKHAH A, JOHNSON D A, PARANJPE D R, *et al.* Temporary sutureless amniotic membrane patch for acute alkaline burns[J]. *Arch Ophthalmol*, 2008, 126(8): 1059-1066.
- [7] MAHARAJAN V S, SHANMUGANATHAN V, CURRIE A, *et al.* Amniotic membrane transplantation for ocular surface reconstruction: indications and outcomes[J]. *Clin Exp Ophthalmol*, 2007, 35(2): 140-147.
- [8] PANDEY R M, VAJPAYEE R B, BISWAS N R, *et al.* Evaluation of amniotic membrane transplantation as an adjunct to medical therapy as compared with medical therapy alone in acute ocular burns[J]. *Ophthalmology*, 2005, 112(11): 1963-1969.
- [9] JIN C Z, PARK S R, CHOI B H, *et al.* Human amniotic membrane as a delivery matrix for articular cartilage repair[J]. *Tissue Eng*, 2007, 13(4): 693.
- [10] MLIGILICHE N, ENDO K, OKAMOTO K, *et al.* Extracellular matrix of human amnion manufactured into tubes as conduits for peripheral nerve regeneration[J]. *J Biomed Mater Res*, 2002, 63(5): 591-600.
- [11] 邹刚, 徐志, 刘子铭. 人脱细胞羊膜支架促进 Scleraxis 修饰人羊膜间充质干细胞体外成韧带分化[J]. *中国组织工程*, 2021, 25(7): 1037-1044.
- [12] 阳洁, 李飞. 生物支架材料在神经损伤修复与再生中应用的研究进展[J]. *解剖学研究*, 2020, 42(3): 272-275.
- [13] 张艳珉, 姜治伟, 杨国利, 等. 脱细胞外基质支架材料在骨再生中的应用及研究进展[J]. *口腔医学*, 2020, 40(1): 63-66.
- [14] 马鑫, 张长青. 小肠粘膜下层体外细胞支架材料的应用[J]. *国外医学: 骨科学分册*, 2005, 26(4): 226-228.
- [15] 李文武, 鲍传裕, 李元明. 骨髓间充质干细胞移植在急性肝衰竭中的应用效果及对 IL-10 水平的影响研究[J]. *中国免疫学杂志*, 2020, 17: 774-779.
- [16] SHI M, ZHANG Z, XU R, *et al.* Human mesenchymal stem cell transfusion is safe and improves liver function in acute-on-chronic liver failure patients[J]. *Stem Cells Transl Med*, 2012, 1(10): 725-731.
- [17] 朴正福, 丁淑琴, 张海燕, 等. 人羊膜间充质干细胞的分离与分化潜能的研究[J]. *生物医学工程与临床*, 2010, 14(1): 15-19.
- [18] 谢雪峰, 陈刚, 吴复跃. 兔包皮来源的上皮细胞与人来源脱细胞羊膜基质(HAAM)组织工程共同培养细胞层片的体外研究[J]. *复旦学报(医学版)*, 2019, 46(3): 399-403.
- [19] 李浩, 杨振, 高仓健, 等. 支架材料在组织工程技术修半月板损伤中的应用进展[J]. *中国医药生物技术*, 2020, 15(6): 623-629.
- [20] DAVIS J W. Skin transplantation with a review of 550 cases at the Johns Hopkins Hospital[J]. *Johns Hopkins Med J*, 1910, 15: 307.
- [21] KARI A, MARKKU K, ANTTI V, *et al.* Extracellular matrix components synthesized by human amniotic epithelial cells in culture[J]. *Cell*, 1980, 19(4): 1053-1062.
- [22] PORTMANN-LANZ, C B, OCHSENBEIN-KOLBLE N, MARQUARDT K, *et al.* Manufacture of a cell-free amnion matrix scaffold the supports amnion cell outgrowth in vitro[J]. *Placenta*, 2007, 28(1): 6-13.
- [23] 华萍, 赵淑娥, 赵集帅, 等. 体内植入羊膜的免疫安全性观察[J]. *南昌大学学报(医学版)*, 2010, 50(9): 11-13.
- [24] ENOSAWA S, SAKURAGAWA N, SUZUKI S. Possible use of amniotic cells for regenerative medicine[J]. *Nippon Rinsho*, 2003, 61(3): 396-400.
- [25] 杨继滨. 人羊膜间充质干细胞与人脱细胞羊膜支架的生物相容性[D]. 遵义: 遵义医学院, 2018: 1-58.
- [26] UENO M, MATSUMURA M, WATANABE K, *et al.* Neural conversion of ES cells by an inductive activity on human amniotic membrane matrix[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103(25): 9554-9559.

(收稿日期: 2021-09-01; 修回日期: 2022-03-04; 编辑: 张翰林)