

· 基础研究 ·

基于秀丽隐杆线虫痴呆模型的络塞维 抗阿尔茨海默病药效研究

梁丽娜, 高雅婷, 陈旭, 刘永刚*, 张园园*

北京中医药大学 中药学院, 北京 102488

[摘要] 目的: 基于秀丽隐杆线虫(以下简称线虫)痴呆模型, 探究络塞维抗阿尔茨海默病(AD)的作用及可能机制。方法: 以转基因线虫 CL4176 为模型, 在显微镜下考察络塞维对线虫瘫痪情况、寿命、运动能力、吞咽频率、活性氧(ROS)水平、抗氧化酶活力等指标的影响。结果: 络塞维能够显著降低痴呆模型线虫瘫痪率($P < 0.05$), 延长其寿命, 增强其运动能力, 显著提高其体内超氧化物歧化酶和过氧化氢酶的活力($P < 0.05$), 显著降低其体内 ROS 水平和丙二醛含量($P < 0.05$)。络塞维对模型线虫的吞咽频率没有影响。结论: 基于线虫痴呆模型, 络塞维有抗阿尔茨海默病的作用, 机制可能与改善氧化应激有关。

[关键词] 络塞维; 抗氧化; 秀丽隐杆线虫 CL4176; 阿尔茨海默病

[中图分类号] R285 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1673-4890(2023)01-0058-06

doi:10.13313/j.issn.1673-4890.20220512002

Efficacy of Rosavin Against Alzheimer's Disease: Based on *Caenorhabditis elegans* (CL4176) Model

LIANG Li-na, GAO Ya-ting, CHEN Xu, LIU Yong-gang*, ZHANG Yuan-yuan*

School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 102488, China

[Abstract] **Objective:** To explore the anti-Alzheimer's disease (AD) effect and possible mechanism of rosavin with *Caenorhabditis elegans*. **Methods:** Transgenic *C. elegans* CL4176 with AD was used, and the effect of rosavin on the paralysis, lifespan, mobility, pharyngeal pumping frequency, reactive oxygen species, and activity of antioxidant enzymes of *C. elegans* CL4176 was observed under the microscope. **Results:** Rosavin can reduce the paralysis rate ($P < 0.05$), prolong the lifespan, improve the mobility, increase the activity of superoxide dismutase and catalase ($P < 0.05$), and decrease the reactive oxygen species and malondialdehyde content in the *C. elegans* CL4176 ($P < 0.05$). It had no influence on the pharyngeal pumping rate of the nematodes. **Conclusion:** It is demonstrated that rosavin showed anti-AD effect on *C. elegans* model, and the possible mechanism may have to do with improving oxidative stress.

[Keywords] rosavin; antioxidation; *Caenorhabditis elegans* CL4176; Alzheimer's disease

衰老是伴随年龄增长机体所面临的无法抗拒的生理性、复杂性生命过程, 机体在衰老过程中出现各系统器官功能退化。近年来, 老年综合征及多种慢性病的全球发病率显著升高^[1]。其中阿尔茨海默病是一种起病隐匿且呈进行性发展的神经系统退行性疾病, 以记忆障碍、智能减退、个性改变和精神行为障碍为临床特征, 严重损害患者的生活质量, 也对家庭和社会造成了极大的负担^[2]。氧化应激与衰老具有十分紧密的联系, 且在阿尔茨海默病的发生、

发展中发挥着重要作用^[3]。

络塞维属于苯丙素类化合物, 化学名为肉桂醇基-O-6-O-(α -L-吡喃阿拉伯糖基)- β -D-吡喃葡萄糖苷(图1), 是由肉桂醇与蚕豆糖所构成的二糖苷。络塞维是玫瑰红景天 *Rhodiola rosea* L. 的特征性成分^[4], 是其治疗抑郁症、疲劳、学习记忆力下降和认知功能障碍的主要物质基础^[5]。据文献报道, 络塞维具有抗疲劳、抗辐射、抗氧化、抗癌、增强免疫力、改善学习记忆能力等多种药理活性, 应用前景广阔^[6]。

* [通信作者] 刘永刚, 研究员, 研究方向: 中药药效物质基础; E-mail: liuyg0228@163.com
张园园, 副教授, 研究方向: 中药化学; E-mail: choenen@163.com

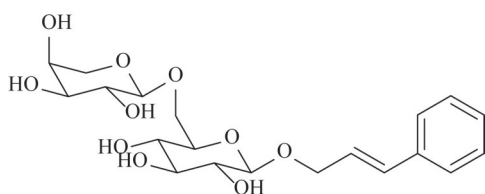


图1 络塞维结构

秀丽隐杆线虫(以下简称线虫) CL4176是一种身体通透、非寄生、全长约1 mm、结构简单、繁殖力强、以细菌为食且培养成本低模式生物,遗传背景清晰,具有60%~80%的人类同源基因^[7]。其生长温度为16 °C,当温度升高至25 °C时,线虫体内会大量表达 β 淀粉样蛋白(A β),从而导致虫体出现瘫痪。使用线虫 CL4176研究神经退行性疾病的报道有很多,如知母皂苷B II通过减轻氧化损伤抑制A β 沉积,起到对衰老相关疾病的预防作用^[8];解毒益智方通过减少线虫 CL4176瘫痪发挥对其的神经保护作用^[9];重组荞麦谷氧还蛋白通过降低线虫 CL4176体内的活性氧(ROS)水平从而预防阿尔茨海默病的发生^[10]。可见线虫痴呆模型被广泛用于抗阿尔茨海默病药物的筛选。

目前,关于络塞维抗阿尔茨海默病的作用及机制鲜有报道,故本研究以线虫 CL4176为模型,以其瘫痪情况、寿命、运动能力、吞咽能力、ROS水平、抗氧化酶活力为检测指标,探讨络塞维抗阿尔茨海默病的药效及可能的机制,为后续玫瑰红景天的开发利用提供参考。

1 材料

1.1 仪器

VD650型超净工作台(浙通品牌有限公司); SMZ745型体式显微镜、ECLIPSE Ts2R型荧光倒置显微镜(尼康映像仪器销售中国有限公司); VORTEX-7型涡旋振荡仪、LX-300型离心机(海门市其林贝尔仪器制造有限公司); GTR10-2型高速冷冻离心机(北京时代北利离心机有限公司); YXQ-LS-50S II型高温高压灭菌锅(上海博迅实业有限公司医疗设备厂); SPX-250型生化培养箱(北京科伟永兴仪器有限公司); Multiskan FC型酶标仪(赛默飞世尔科技有限公司)。

1.2 菌株、线虫

转基因线虫 CL4176、大肠埃希氏菌 *Escherichia*

coli OP50由中国科学院遗传与发育生物学研究所惠赠。

1.3 试药

络塞维为本课题组前期合成^[11](纯度:95%);胰蛋白胨、酵母提取物、蛋白胨、琼脂粉、胆固醇、CaCl₂、MgSO₄、KH₂PO₄、KOH、NaH₂PO₄、NaCl、NaOH、NaClO均为分析纯(北京试剂有限公司);盐酸咪唑(Innochem公司);2-(3,6-二乙酰氧基-2,7-二氯-9H-氧杂蒽-9-基)苯甲酸(上海麦克林生化科技有限公司);丙二醛(MDA)、过氧化氢酶(CAT)、超氧化物歧化酶(SOD)试剂盒(南京建成生物工程研究所)。

2 方法

2.1 络塞维母液的制备

取络塞维0.02 g于2 mL离心管中,加入去离子水0.934 mL进行溶解,配制浓度为50 mmol·L⁻¹的母液。

2.2 线虫的培养及同步化

2.2.1 固体培养基(NGM)配制 分别加入NaCl 0.6 g、琼脂粉3.4 g、蛋白胨0.5 g、胆固醇1 mg,加水定容到195 mL,摇匀后121 °C灭菌20 min。分别加入灭菌后的CaCl₂、MgSO₄各200 μ L,再加入KH₂PO₄-KOH缓冲液5 mL,趁热倒入培养皿中。选取光滑、平整、无气泡,且含有*E. coli* OP50的NGM培养板,将挑选的线虫放在该板上并置于生化培养箱中培养。

2.2.2 线虫同期化处理 配制裂解液[4 mol·L⁻¹ NaOH-水-NaClO(1:1:8)混合,即得],用M9缓冲液将培养皿上的卵和体内有卵的线虫一起冲洗至离心管中,去掉上清液,加入裂解液,至虫体裂解后,3000 r·min⁻¹离心2 min(离心半径为12 cm),将虫卵打到样品板中。

2.3 加药组与模型组NGM的配制

模型组NGM的配制方法同2.2.1项下。加药组在模型组NGM中加入络塞维,分别配制成浓度为100、200、300 μ mol·L⁻¹的含药NGM。

2.4 瘫痪实验

同步化的线虫卵放在不同浓度加药组和模型组培养基中,使虫卵在16 °C下孵化生长48 h左右,转

移到新的NGM培养皿,每皿30条。然后将线虫转移至25℃培养箱,每2h观察线虫瘫痪情况,直至所有线虫瘫痪。观察期间线虫身体不动,只有头部摆动,用铂丝触碰身体后无运动认定为瘫痪^[12]。

2.5 寿命实验

将同步化至L3期线虫随机挑取至加药组与模型组培养基中,每皿30条,16℃培养24h,将培养基转移至25℃恒温培养箱中进行培养。此时记录线虫生存第0天,升温培养可加速线虫衰老。为防止卵及幼虫的发育影响计数,添加5-氟尿嘧啶到NGM中。每隔2d挑取线虫到对应的NGM中,直至所有线虫死亡,同时统计每个培养皿中线虫存活数量^[13]。

2.6 运动能力测定

将同步化至L3期的线虫随机挑取至加药组与模型组培养基中,每皿50条,于16℃恒温培养箱中培养。给药4d后,将线虫转移至新的培养皿中,加入M9溶液,各组随机挑取10条线虫,在体式显微镜下每次跟踪1只,计时30s,统计线虫身体弯曲次数^[14]。

2.7 吞咽频率测定

将同步化至L3期的线虫随机挑取至加药组与模型组培养基中,每皿50条,在第4、6天随机挑取10条线虫观察同等时间内吞咽次数,线虫头部吞咽泵上下移动1次记作1次跳动,在体式显微镜下每次跟踪1只,计时20s^[15]。

2.8 ROS含量测定

将同步化至L3期的线虫转移至加药组与模型组培养基中,每皿30条,16℃培养36h,然后将线虫转移至25℃培养箱处理36h。将各组培养好的线虫转移到1.5mL离心管中,用M9缓冲液冲洗3~5次,3000r·min⁻¹离心30s(离心半径为12cm),随后加入2',7'-二氯二氢荧光素二乙酸酯(H₂DCF-DA,终浓度为200μmol·L⁻¹)150μL,室温避光孵育3h^[16]。随后将线虫转移至滴加盐酸咪唑溶液的琼脂糖垫上,用荧光倒置显微镜拍摄荧光图片(激发波长485nm,发射波长530nm),用ImageJ1.8.0软件测量荧光强度值。

2.9 抗氧化酶含量测定

同步化的线虫卵放在加药组和模型组培养基中,16℃培养4d后,将线虫转移至25℃培养箱中培养48h。用M9缓冲液将线虫冲洗至离心管中,重复3次,

用自动匀浆器将线虫匀浆,4℃下12000r·min⁻¹,离心10min(离心半径为13cm),取上清液,用BCA试剂盒测定蛋白质含量,用试剂盒测定SOD、MDA、CAT活性。

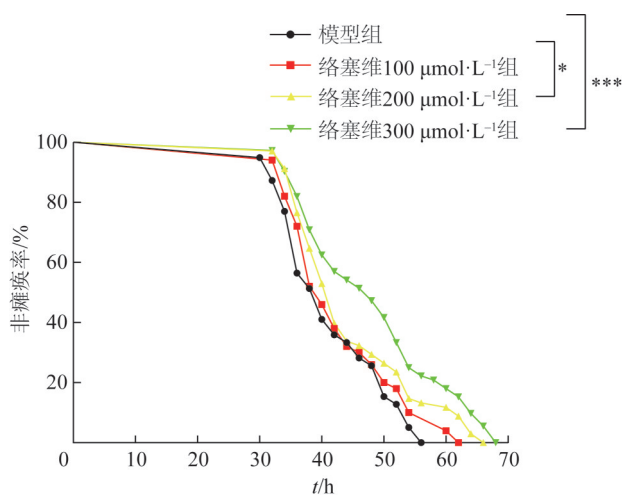
2.10 数据统计

所有实验重复3次,实验数据以($\bar{x} \pm s$)表示,分析组间差异用 t 检验或方差分析,生存分析采用对数秩检验(log-rank test)进行分析。采用SPSS 20.0软件进行数据处理, $P < 0.05$ 时差异有统计学意义,采用GraphPad Prism 8.0统计分析软件作图。

3 结果

3.1 瘫痪实验

与模型组比较,络塞维200、300μmol·L⁻¹组线虫僵化速率延缓,见图2。50%线虫发生瘫痪时间定义为PT₅₀^[17]。与模型组比较,300μmol·L⁻¹络塞维处理后,线虫PT₅₀延长了9.3h($P < 0.05$),见图3。这表明络塞维可以缓解Aβ蛋白沉积对线虫的毒性作用。瘫痪实验中300μmol·L⁻¹的络塞维效果最好,因此后续实验使用此浓度。



注:与模型组比较,* $P < 0.05$,*** $P < 0.001$;图3同。

图2 络塞维对线虫瘫痪情况的影响

3.2 寿命实验

结果显示,模型组线虫的平均寿命为(8.790±0.478)d,最长寿命为11d。络塞维组线虫平均寿命为(9.675±0.339)d,最长寿命为12d。与模型组相比,300μmol·L⁻¹的络塞维明显增加线虫寿命,延长率为10.1%,见图4。

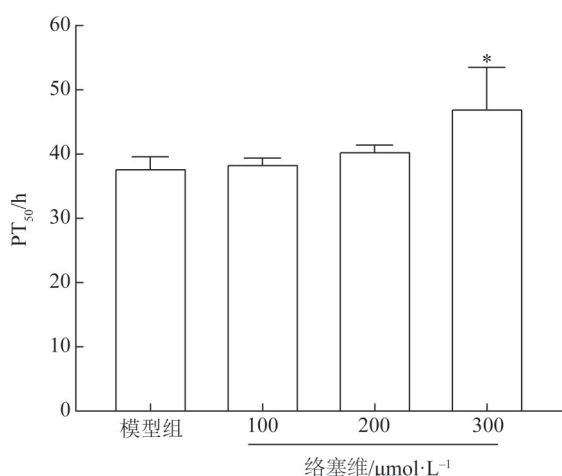
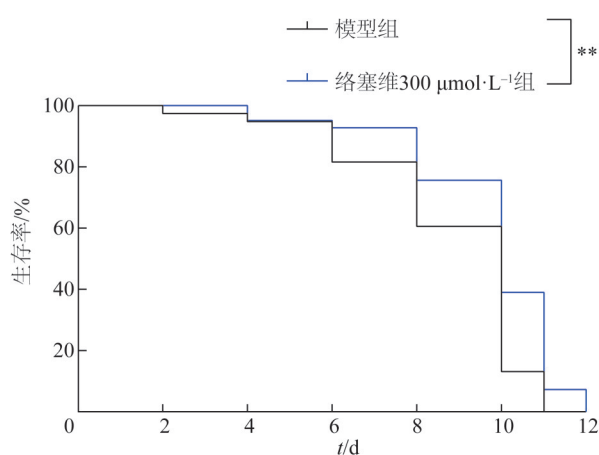


图3 络塞维对线虫PT₅₀值的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n=30$)



注:与模型组比较, ** $P<0.01$ 。

图4 络塞维对线虫寿命的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n=30$)

3.3 运动能力

线虫衰老的明显特征之一是其运动能力的下降,运动能力也是反映其整体活跃程度的重要指标^[18]。模型组线虫30 s内身体弯曲次数为 19.530 ± 1.168 ,络塞维给药4 d后,线虫身体弯曲次数为 24.230 ± 1.779 ,与对照组比较增加了24.07% ($P<0.05$)。

3.4 吞咽频率

线虫吞咽能力实验是线虫抗衰老实验的一种,正常生理状况下,吞咽速率反映线虫进食的能力,进而间接反映线虫的衰老程度^[19]。实验第4天,模型组和络塞维 $300\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组线虫20 s内吞咽次数分别为 42.37 ± 2.97 、 42.70 ± 1.95 ,第6天分别为 33.87 ± 5.08 、 36.10 ± 3.99 。与模型组比较,络塞维组线虫吞咽频率差异无统计学意义,说明络塞维不影响线

虫的摄食能力。

3.5 ROS含量

研究表明,ROS有很强的氧化能力,能与机体内大分子如蛋白质、脂质、DNA结合,导致细胞损伤^[20]。模型组线虫体内相对荧光强度为 1.002 ± 0.050 ,络塞维组线虫体内相对荧光强度为 0.834 ± 0.030 。与模型组比较,络塞维 $300\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组线虫体内ROS水平显著降低 ($P<0.01$),代表性荧光图见图5。表明络塞维在线虫体内表现较强的抗氧化能力,抗阿尔茨海默病的作用机制可能与改善氧化应激有关。

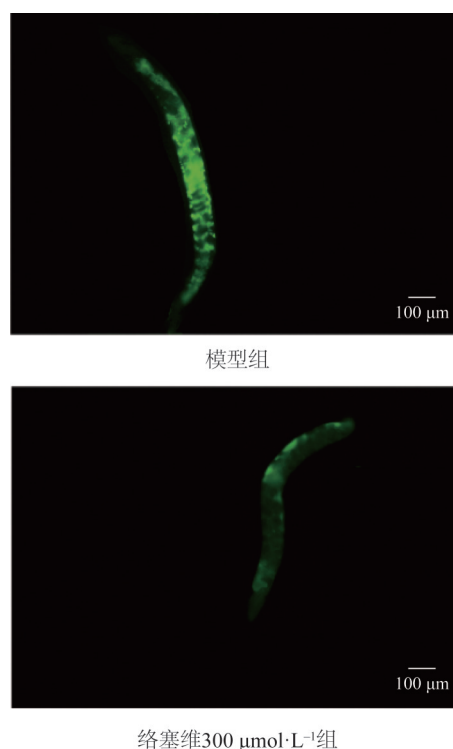


图5 线虫体内ROS水平荧光图

3.6 抗氧化酶活性

抗氧化酶在减少氧化损伤中起着重要作用^[21]。模型组与络塞维 $300\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组线虫SOD活力分别为 (31.74 ± 2.07) 、 $(38.67\pm 0.96)\ \text{U}\cdot\text{mg}^{-1}$,CAT活力分别为 (7.37 ± 0.50) 、 $(11.62\pm 0.58)\ \text{U}\cdot\text{mg}^{-1}$ 。络塞维处理后能够显著提高模型线虫体内的SOD、MDA活力 ($P<0.01$, $P<0.001$)。SOD、CAT是线虫体内主要的抗氧化酶,酶活力的升高标志着线虫抗氧化能力的增强^[22]。脂质过氧化终产物MDA的堆积,其具有一定的细胞毒性,因此其含量可以反映生物体内

脂质氧化的程度,间接反映出细胞受损情况^[23]。模型组与络塞维 300 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组线虫MDA含量分别为(8.03±0.20)、(6.47±0.22) $\text{nmol}\cdot\text{mg}^{-1}$ 。相较于模型组,给药组线虫体内MDA含量显著降低($P<0.001$),表明络塞维在一定程度上能够提高线虫体内抗氧化能力,缓解氧化损伤。

4 讨论

阿尔茨海默病的治疗是近年来研究的热点,但其发病机制并未完全阐明。氧化应激状态是阿尔茨海默病临床研究的热点,CAT、SOD、谷胱甘肽及MDA等为常见的氧化应激指标,在神经及其他多系统损伤修复过程中均发挥着作用。阿尔茨海默病患者脑组织负荷氧较高,但神经元抗氧化酶却相对较少,氧自由基的清除能力较差,因此受氧化损伤的影响较大,对于氧化损伤的敏感性也较高,这可能是导致其病理性变化的重要原因之一^[24]。在针对动物和人类的研究中均发现,氧化应激可能促进了A β 的沉积,而降低氧化应激水平可能延缓阿尔茨海默病,从而改善认知功能障碍^[25]。

络塞维作为玫瑰红景天主要活性成分之一,在抗氧化方面有明显的优势。马天翔等^[26]研究发现络塞维对1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH)自由基、超氧阴离子自由基、氮氧自由基有较强的清除能力,从而发挥抗氧化作用。Zhong等^[27]研究发现,在DPPH自由基清除实验中,络塞维表现出优异的活性,其半数抑制浓度(IC₅₀)值为5.9 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$,比没食子酸、没食子酸乙酯和草质素表现出更好的还原能力。张慧云^[28]研究发现,络塞维可以提高总抗氧化能力,减少运动后的氧化还原应激程度,提高抗氧化酶SOD的活性,抑制脂质过氧化物MDA的产生。谭海龙等^[29]研究发现,络塞维能够通过减轻大鼠体内的氧化应激反应改善大鼠学习记忆能力下降现象,从而发挥抗痴呆作用。本研究结果同样发现络塞维在痴呆模型线虫CL4176体内也能够发挥抗氧化应激作用。

本研究以线虫CL4176为模型,探讨了络塞维对线虫瘫痪、寿命、运动、吞咽、活性氧、抗氧化酶等方面的影响,结果表明,络塞维对线虫的氧化损伤和衰老具有一定的保护作用。络塞维组的线虫瘫痪率低于模型组,表示络塞维能够减轻A β 毒性,缓解氧化损伤;与模型组相比,络塞维组线虫的生存

曲线右移,即络塞维对延缓衰老、延长寿命起到了积极的作用;络塞维组线虫的运动能力强于模型组,即络塞维在一定程度上能够延缓衰老、提高运动能力;络塞维对线虫吞咽频率不会产生显著影响;络塞维组线虫的ROS含量低于模型组,表示络塞维能显著降低线虫体内ROS含量,以减少氧化损伤;络塞维组线虫的体内抗氧化相关酶活力高于模型组,表示络塞维有良好的抗氧化活性。本研究结果表明,络塞维有抗阿尔茨海默病作用,机制可能与改善氧化应激有关,有待深入研究。综上所述,本研究可为深入开展络塞维及玫瑰红景天的抗衰老研究提供参考。

参考文献

- [1] 史敏,孙琳,李倩,等. 黄芩素在衰老相关疾病中的作用及机制研究进展[J]. 中国美容医学,2021,30(4):176-180.
- [2] 张宇涵,邢天阳,彭宇,等. 中文版老年痴呆恐惧量表的信度与效度检验[J]. 循证护理,2022,8(10):1368-1371.
- [3] KANG S, LEE Y H, LEE J E. Metabolism-centric overview of the pathogenesis of Alzheimer's disease[J]. Yonsei Med J,2017,58(3):479-488.
- [4] YU G, LI N, ZHAO Y, et al. Salidroside induces apoptosis in human ovarian cancer SKOV3 and A2780 cells through the p53 signaling pathway[J]. Oncol Lett,2018,15(5):6513-6518.
- [5] NABAVI S F, BRAIDY N, ORHAN I E, et al. *Rhodiola rosea* L. and Alzheimer's disease: From farm to pharmacy[J]. Phytother Res,2016,30(4):532-539.
- [6] DING X J, ZHANG Z Y, JIN J, et al. Salidroside can target both P4HB-mediated inflammation and melanogenesis of the skin[J]. Theranostics,2020,10(24):11110-11126.
- [7] WYSS-CORAY T. Ageing, neurodegeneration and brain rejuvenation[J]. Nature,2016,539(7628):180-186.
- [8] 宗茹敏,王雅丽,黄琪,等. 知母皂苷B-II抑制秀丽隐杆线虫A β 蛋白毒性作用及机制研究[J]. 中成药,2021,43(7):1740-1745.
- [9] 祝越美,黎明全,关树文,等. 解毒益智方对阿尔茨海默病转基因线虫神经保护及A β 肽聚集作用的影响[J]. 中国老年学杂志,2018,38(23):5789-5791.
- [10] 李芳,崔晓东,马晓丽,等. 谷氨还蛋白rbGrx可延缓CL4176秀丽隐杆线虫中 β 淀粉样蛋白诱导的毒性[J]. 中国生物化学与分子生物学报,2018,34(8):844-853.
- [11] 钟婷,胡亚丹,苏进,等. 玫瑰红景天活性成分络塞维

- 的合成研究[J]. 中国现代中药, 2021, 23(5): 781-785.
- [12] 温新华. 黑豆皮花青素对 *C. elegans* 衰老及阿尔茨海默症的影响[D]. 太原: 山西大学, 2020.
- [13] 李元通. 连翘花提取物减轻AD模型线虫 $A\beta$ 诱导毒性及其机制研究[D]. 太原: 山西大学, 2021.
- [14] 陈宇. 银杏叶黄酮延长秀丽隐杆线虫寿命及作用机制研究[D]. 重庆: 重庆三峡学院, 2021.
- [15] 张训乐, 王姗姗, 赵佳惠, 等. 保元汤对秀丽隐杆线虫的抗衰老作用及机制研究[J]. 河北中医, 2021, 43(9): 1519-1524.
- [16] SINGH N K, SONANI R R, AWASTHI A, et al. Phycocyanin moderates aging and proteotoxicity in *Caenorhabditis elegans*[J]. J Appl Phycol, 2016, 28(4): 2407-2417.
- [17] 周玲, 王长江, 黄敏, 等. 六味地黄丸加三七水提液对秀丽线虫抗氧化、缓解 $A\beta$ 毒性及健康寿命的影响[J]. 中华中医药杂志, 2017, 32(5): 1903-1909.
- [18] 黄子亮. 秀丽隐杆线虫运动能力的衰减及其干预研究[D]. 广州: 广东药科大学, 2021.
- [19] 魏倩因, 王素娟, 刘佳奇, 等. 抗癌烷化剂三溴基丙酮酸对秀丽隐杆线虫衰老指标及寿命的影响[J]. 中国当代医药, 2020, 27(17): 4-7.
- [20] 黄琦, 陈颖, 冯晓红. 人参皂苷对波动性高糖致内皮细胞损伤ROS和HO-1表达的影响[J]. 山东中医药大学学报, 2016, 40(1): 69-71.
- [21] OGAWA T, KODERA Y, HIRATA D, et al. Natural thioallyl compounds increase oxidative stress resistance and lifespan in *Caenorhabditis elegans* by modulating SKN-1/Nrf[J]. Sci Rep, 2016, 6: 21611.
- [22] GRUBER J, NG L F, POOVATHINGAL S K, et al. Deceptively simple but simply deceptive: *Caenorhabditis elegans* lifespan studies: Considerations for aging and antioxidant effects[J]. FEBS Lett, 2009, 583(21): 3377-3387.
- [23] ZHOU M, ZHU J, YU H, et al. Investigation into *in vitro* and *in vivo* models using intestinal epithelial IPEC-J2 cells and *Caenorhabditis elegans* for selecting probiotic candidates to control porcine enterotoxigenic *Escherichia coli*[J]. J Appl Microbiol, 2014, 117(1): 217-226.
- [24] 贾宝云. 老年痴呆患者认知功能与氧化应激、脑灌注状态的关系探究[J]. 中国现代药物应用, 2022, 16(5): 1-5.
- [25] 史涛涛, 罗世坚, 梁凤银, 等. 海松子提取物减轻阿尔茨海默病线虫 $A\beta$ 毒性及机制探讨[J]. 中国新药杂志, 2019, 28(8): 996-1000.
- [26] 马天翔, 史宁, 陈乾, 等. 红景天中8种成分体外抗氧化作用的比较[J]. 中国药理学通报, 2012, 28(9): 1224-1228.
- [27] ZHONG L Y, PENG L X, FU J, et al. Phytochemical, antibacterial and antioxidant activity evaluation of *Rhodiola crenulata*[J]. Molecules, 2020, 25(16): 3664.
- [28] 张慧云. 玫瑰红景天中络塞维的纯化及抗疲劳特性研究[D]. 无锡: 江南大学, 2013.
- [29] 谭海龙, 师超, 卢婧. 络塞维改善D-半乳糖致亚急性衰老大鼠的学习记忆力的机制初探[J]. 中国药师, 2015, 18(10): 1729-1732.

(收稿日期: 2022-05-12 编辑: 田苗)