

SFRP5 抑制 Wnt/ β -catenin 通路减轻肾小管 上皮细胞上皮-间质转化

邓岱, 吴逸如, 白雨, 刁宗礼, 黄红东, 刘文虎
首都医科大学附属北京友谊医院肾内科, 北京 100050

摘要: **目的** 探讨分泌型卷曲相关蛋白 5(SFRP5)在肾小管上皮细胞上皮-间质转化(EMT)中的作用及机制。**方法** 体外以转化生长因子(TGF)- β 1 刺激人近端肾小管上皮细胞系 HK-2 细胞,给予 SFRP5 与细胞共孵育,应用 Western Blot 法及 RT-qPCR 检测细胞中的 EMT 指标[E-钙黏蛋白(E-cadherin)和 α 平滑肌肌动蛋白(α -SMA)]的 mRNA 和蛋白表达水平,Western Blot 法检测纤维化指标[Fibronectin(Fn)和 Collagen I(Col-I)]的蛋白水平;并检测 Wnt/ β -catenin 信号通路中细胞质中磷酸化 β -catenin 或细胞核中活化 β -catenin 蛋白水平, TOP/FOP-Flash 荧光素酶试验评估 β -catenin 激活介导的转录及下游靶基因 c-Myc 和 cyclin D1 的 mRNA 水平。**结果** TGF- β 1 刺激后上皮细胞固有 E-cadherin 水平下降,而 α -SMA、Fn 和 Col-I 表达增多($P<0.05$);胞质中磷酸化(p-S37 位点) β -catenin 减少且核内 β -catenin 水平增加, TOP/FOP 比率上升,靶基因 c-Myc 和 cyclin D1 转录增加($P<0.05$)。加入 SFRP5 共培养细胞后,上述 EMT 及纤维化指标变化被逆转,异常激活的 Wnt/ β -catenin 通路中各标志物被抑制,再加入 SFRP5 特异性中和抗体后 SFRP5 的抑制及保护作用被取消($P<0.05$)。**结论** 本研究首次发现 SFRP5 可以减轻 TGF- β 1 诱导的肾小管上皮细胞 EMT 和纤维化,其机制与抑制异常激活的 Wnt/ β -catenin 信号通路相关,这可能成为临床诊治及延缓慢性肾脏病进展的新靶点。

关键词: 肾间质纤维化; 上皮-间质转化; 分泌型卷曲相关蛋白 5; Wnt/ β -catenin 信号通路

中图分类号: R594 **文献标识码:** B **文章编号:** 1674-8182(2023)07-1022-05

Inhibition of Wnt/ β -catenin pathway by SFRP5 attenuating epithelial-mesenchymal transition of renal tubular epithelial cells

DENG Dai, WU Yiru, BAI Yu, DIAO Zongli, HUANG Hongdong, LIU Wenhui

Department of Nephrology, Beijing Friendship Hospital, Capital Medical University, Beijing 100050, China

Corresponding author: LIU Wenhui, E-mail: wenhuliu@mail.ccmu.edu.cn

Abstract: Objective To explore the role and mechanism of secreted frizzled related protein 5(SFRP5) in epithelial to mesenchymal transition(EMT) of renal tubular epithelial cells. **Methods** The human proximal renal tubular epithelial cell line HK-2 cells were stimulated by transforming growth factor (TGF)- β 1 *in vitro* and incubated with or without SFRP5. The mRNA and protein expression of EMT indexes including E-cadherin and α -SMA were detected by quantitative real-time PCR and Western Blot. The protein levels of fibrosis indexes [Fibronectin (Fn) and Collagen I (Col-I)] were also evaluated. The level of phosphorylated β -catenin in cytoplasm or activated β -catenin in nucleus of Wnt/ β -catenin signaling pathway was detected by WB. The TOP/FOP-flash luciferase assay was used to evaluate β -catenin-mediated transcription, in addition, the mRNA levels of downstream target genes c-Myc and cyclin D1 were measured. **Results** The original E-cadherin level of renal epithelial cells decreased, while α -SMA, Fn and Col-I increased after TGF- β 1 stimulation. The cytoplasmic level of phosphorylation (site p-S37) of β -catenin decreased and nuclear level of β -catenin increased ($P<0.05$). The TOP/FOP ratio was up-regulated, and the transcription of the target genes c-Myc and cyclin D1 increased ($P<0.05$). After adding SFRP5 to treat cells, the changes of EMT and fibrosis

DOI: 10.13429/j.cnki.cjcr.2023.07.012

基金项目: 国家自然科学基金青年科学基金资助项目 (82000700)

通信作者: 刘文虎, E-mail: wenhuliu@mail.ccmu.edu.cn

出版日期: 2023-07-20

indexes were reversed, and the above-mentioned markers in abnormally activated Wnt/ β -catenin pathway were inhibited, and the inhibiting and protecting effects of SFRP5 were cancelled by SFRP5 specific neutralizing antibody ($P < 0.05$). **Conclusion** In this study, it has been found for the first time that SFRP5 can ameliorate the EMT and fibrosis in renal tubular epithelial cells induced by TGF- β 1. The mechanism is related to the inhibition of abnormally activated Wnt/ β -catenin signaling pathway, which may become a new target for clinical diagnosis and treatment and delaying the progress of chronic kidney disease.

Keywords: Renal interstitial fibrosis; Epithelial-mesenchymal transition; Secreted frizzled related protein 5; Wnt/ β -catenin signalling pathway

Fund program: Youth Science Foundation of the National Natural Science Foundation of China(82000700)

慢性肾脏病(chronic kidney disease, CKD)发病率高,病程长且预后差,已成为全球性严重威胁人类健康的公共卫生问题^[1]。延缓CKD进展至关重要的措施之一是抑制CKD至终末期肾脏病的共同的病理机制——肾间质纤维化(renal interstitial fibrosis, RIF)^[2]。其中肾小管上皮细胞(renal tubular epithelial cell, RTC)上皮-间质转化(epithelial to mesenchymal transition, EMT)——上皮细胞在病理条件下转化为具有间质表型细胞的生物学过程,被认为是肾纤维化发生发展的重要机制之一^[3]。近年研究显示Wnt/ β -catenin信号通路的异常激活参与RIF及EMT,抑制该通路或可成为改善肾纤维化的治疗新靶点^[4-5]。分泌卷曲相关蛋白5(secreted frizzled related-protein 5, SFRP5)作为新定义的脂肪因子,也是重要的Wnt信号通路抑制剂,具有抗炎和抗纤维化作用。既往研究显示SFRP5可抑制相应Wnt通路改善肝脏纤维化、口腔黏膜下纤维化,SFRP5的异常甲基化可促进硫酸吡啶酚诱导的肾纤维化^[6-8],而SFRP5能否直接通过Wnt/ β -catenin通路影响EMT及RIF目前尚无相关研究。

基于本团队前期研究发现SFRP5可影响Wnt/ β -catenin通路减轻大鼠单侧输尿管结扎造成梗阻(unilateral ureters obstruction, UUO)所致RIF,为进一步探究机制,本研究给予SFRP5干预转化生长因子(transforming growth factor, TGF)- β 1诱导的RTC模型,观察SFRP5对EMT的作用并探讨其涉及的机制,以期能为RIF治疗提供新依据及靶点。

1 材料与方法

1.1 细胞培养与刺激 (1) 细胞培养: 购自美国ATCC公司的人近端肾小管上皮细胞系HK-2细胞,以含5%胎牛血清的DMEM培养液(美国Sigma公司)于37℃、5%CO₂的细胞孵育箱中传代培养,每48小时更换培养液。选用第3~4代细胞生长至70%~80%融合时,给予无血清培养基饥饿处理细胞12h以

达到同步化。(2) 刺激干预: 向培养液中加入TGF- β 1(2 ng/mL)刺激细胞构建EMT模型,再分别以SFRP5(100 ng/mL)、SFRP5特异性中和抗体(anti-SFRP5)或对照中和抗体(control IgG),浓度均为1 μ g/mL共培养细胞72h,收获细胞用于相关检测。以上试剂购自美国R&D Systems公司。

1.2 实时荧光定量PCR(RT-qPCR) 以胰酶消化培养瓶中的细胞,Trizol提取总RNA,紫外分光光度计检测并计算mRNA浓度。以提取的总RNA进行反转录,反应条件: 42℃反应60 min,95℃反应5 min,冰上骤冷结束反应,cDNA产物置于-20℃保存。根据Genebank序列,设计 α 平滑肌肌动蛋白(α -SMA)、E-钙黏蛋白(E-cadherin)、原癌基因蛋白(c-Myc)、细胞周期蛋白D1(cyclin D1)和3-磷酸甘油醛脱氢酶(GAPDH)引物序列并合成(表1)。按下列参数进行荧光扩增,50℃ 2 min,95℃ 10 min,95℃ 15 s,60℃ 1 min,共40个循环。以各指标与内参GAPDH产物量的比值表示mRNA相对表达量。

表1 RT-qPCR引物序列
Tab. 1 RT-qPCR primer sequence

引物	序列						
α -SMA	F 5'-ACT	GCC	TTG	GTG	TGT	GAC	AA-3'
	R 5'-TCC	CAG	TTG	GTG	ATG	ATG	CC-3'
E-cadherin	F 5'-TCA	TGA	GTG	TCC	CCC	GGT	AT-3'
	R 5'-TCT	TGA	AGC	GAT	TGC	CCC	AT-3'
c-Myc	F 5'-CTA	CTT	GGA	GGA	GAC	ATG	GTG-3'
	R 5'-TGG	AGG	TGG	AGC	AGA	CG-3'	
cyclin D1	F 5'-AGT	AGC	AGC	GAG	CAG	CAG	ACT-3'
	R 5'-TTC	ATC	TTA	GAG	GCC	ACG	AA-3'
GAPDH	R 5'-TGG	AGG	TGG	AGC	AGA	CG-3'	
	F 5'-GAG	GCT	CTC	TTC	CAG	CCT	TC-3'

1.3 免疫印迹 Western Blot(WB) 收取细胞后以RIPA液裂解细胞,BCA法测定蛋白浓度,99℃ 10 min变性蛋白,吸取20 μ L样本注入加样槽后以常规电泳、转膜、封闭、一抗孵育,稀释比例为GAPDH 1 : 5 000,SFRP5 1 : 100, α -SMA 1 : 1 000,E-cadherin 1 : 500,纤维连接蛋白[Fibronectin(Fn)] 1 : 1 000,

I型胶原[Collagen I(Col-I)] 1:500, β -catenin 1:1000, 磷酸化 β -连环蛋白[phospho- β -catenin(S37)] 1:1000, histone H3 1:1000; 后以二抗辣根过氧化物酶(1:10000)孵育、蛋白检测、凝胶图像分析进行测定。

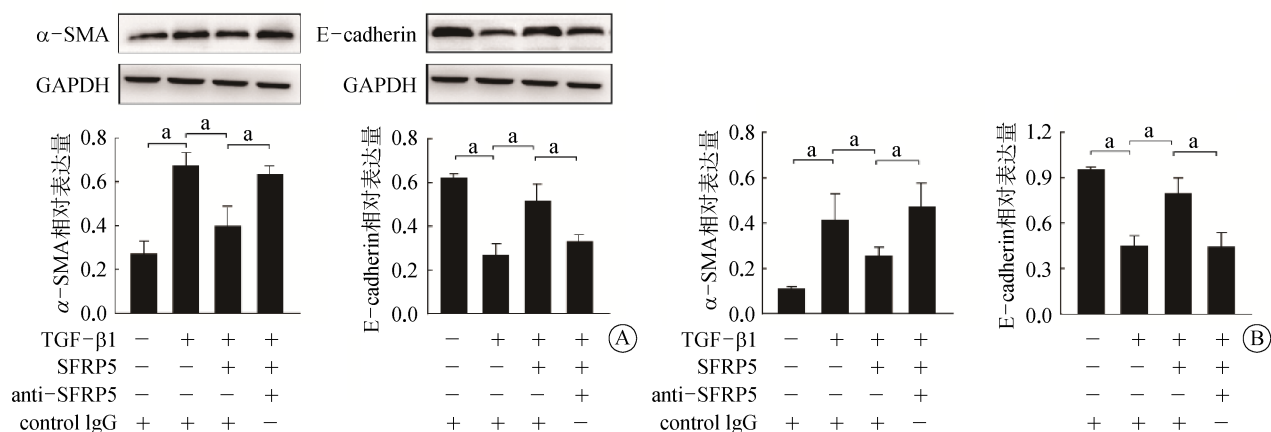
1.4 荧光素酶活性测定 应用TOP/FOP-Flash 荧光素酶试验评估 β -catenin 介导的转录。细胞在24孔板中生长至60%~70%后,用含有多个T细胞因子/淋巴增强因子(TCF/LEF)共有位点的TOP-Flash 报告质粒(美国Promega公司)和Renilla对照质粒(内部对照)瞬时转染,含有突变的TCF/LEF结合位点的FOP-Flash质粒作为阴性对照。转染6h后,用TGF- β 1(2 ng/mL)或TGF- β 1+SFRP5(100 ng/mL)处理细胞,将其加入对照IgG或TGF- β 1+SFRP5+anti-SFRP5(1 μ g/mL)培养基中72h,然后收集细胞予荧光素酶测定系统评价活性以作量化。

1.5 统计学方法 所有实验均平行重复3次,数据

采用SPSS 22.0软件处理。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用方差分析,两两比较采用LSD-*t* 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

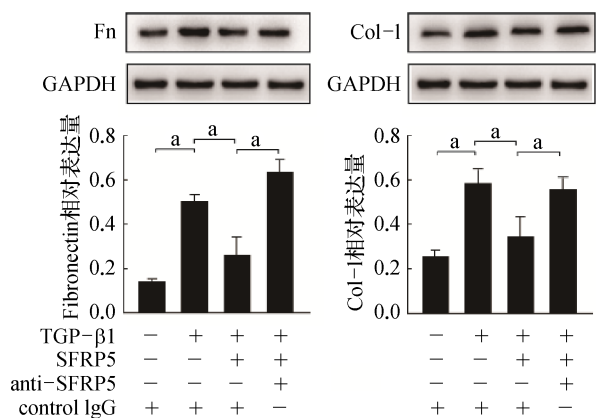
2.1 SFRP5 抑制 TGF- β 1 诱导的 RTC 间质转化和纤维化 外源性给予SFRP5可减轻TGF- β 1诱导的RTC EMT和纤维化。TGF- β 1干预组的细胞EMT指标显著高于对照组,表现为上皮黏附受体E-cadherin的丢失,取而代之以间充质标记物 α -SMA的增多。WB和RT-qPCR结果显示:SFRP5在mRNA和蛋白水平上明显逆转了TGF- β 1诱导的E-cadherin表达减少和 α -SMA增加($P < 0.05$,图1A、1B)。进一步研究了RTC纤维化指标Fn和Col-I的变化,与EMT变化一致,WB检测结果表明SFRP5可在体外减轻TGF- β 1诱导的RTC纤维化($P < 0.05$,图2)。



注:结果以GAPDH标准化后比值表示;A为蛋白检测结果;B为mRNA检测结果;两两比较, $^a P < 0.05$ 。

图1 TGF- β 1 诱导的 RTC EMT 被 SFRP5 抑制 ($n=3$)

Fig. 1 TGF- β 1 induced EMT in RTCs inhibited by SFRP5 ($n=3$)



注:结果以GAPDH标准化后比值表示;两两比较, $^a P < 0.05$ 。

图2 TGF- β 1 诱导的 RTC 纤维化被 SFRP5 抑制 ($n=3$)

Fig. 2 TGF- β 1 induced fibrosis in RTCs inhibited by SFRP5 ($n=3$)

2.2 SFRP5 通过 Wnt/ β -catenin 信号通路改善 EMT 和纤维化 为探究SFRP5上述保护作用所涉及的分子机制,检测上述体外模型中Wnt/ β -catenin信号通路的变化,结果显示异常激活的该通路可被SFRP5抑制。首先应用WB检测细胞质中磷酸化的 β -catenin和转移到细胞核中的游离 β -catenin水平以评估该通路的激活情况:TGF- β 1处理使细胞核内 β -catenin水平上升,而细胞质中S37残基磷酸化(p-S37)的 β -catenin水平受到限制,提示 β -catenin被活化而增加核内转移。SFRP5干预显著降低 β -catenin的细胞核内水平并恢复了胞质中磷酸化水平—— β -catenin的活化被抑制;而SFRP5上述抑制作用可被

特异性 anti-SFRP5 抗体逆转 ($P<0.05$, 图 3A)。进一步分析以 TCF/LEF 核转染和双荧光素酶报告基因检测直接评估 β -catenin 依赖性转录激活。图 3B 表明以 TGF- β 1 处理后,代表 Wnt/ β -catenin 通路活化的 TCF/LEF 荧光素酶活性结果显示与对照组相比约两倍的上调,然而这种活化现象可被 SFRP5 显著减弱

($P<0.05$),提示 SFRP5 在抑制 EMT 及纤维化过程中对于 Wnt/ β -catenin 通路的抑制。为验证该通路的变化, β -catenin 的下游靶基因 c-Myc 和 cyclin D1 转录检测结果显示: TGF- β 1 上调的直接转录靶基因 c-Myc 和 cyclin D1 水平可被 SFRP5 下调抑制,但特异性 anti-SFRP5 抗体取消了 SFRP5 的作用($P<0.05$,图 4)。

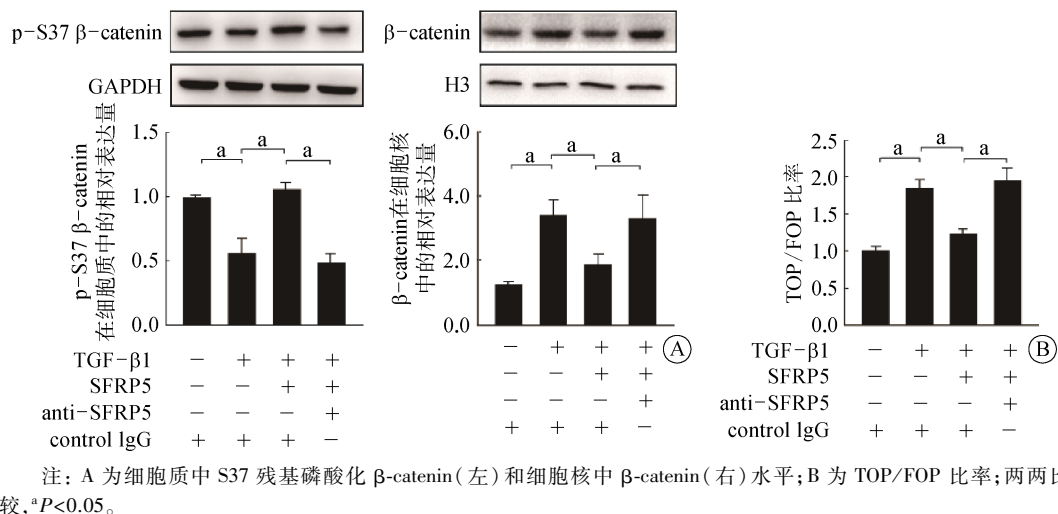


图 3 SFRP5 通过抑制 Wnt/ β -catenin 信号通路减轻 RTC 的 EMT 和纤维化 ($n=3$)

Fig. 3 EMT and fibrosis in RTCs alleviated by SFRP5 through inhibiting Wnt/ β -catenin signaling pathway ($n=3$)

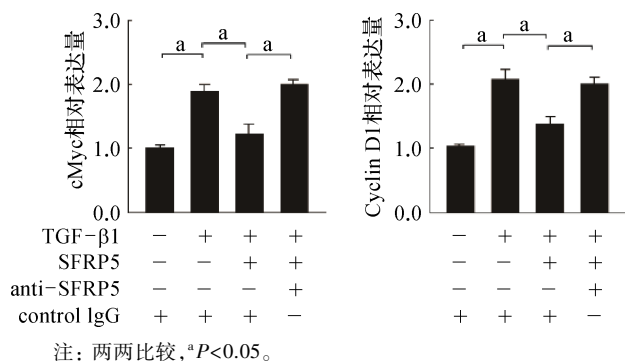


图 4 β -catenin 的下游靶基因 c-Myc 和 cyclin D1 转录检测结果 ($n=3$)

Fig. 4 Detection results of transcriptional of downstream target genes c-Myc and cyclin D1 of β -catenin ($n=3$)

3 讨论

CKD 病程中引起肾功能丢失最常见的病理特征之一即是进行性 RIF^[9-10],目前临床疗效有限,需要探索新的机制与药物通过防治肾纤维化来延缓 CKD 进展。肾纤维化的主要特征变化是大量成纤维细胞取代了正常肾单位,导致细胞外基质产生和积聚,包括 collagen 和 fibronectin, RIF 的重要环节 EMT 表现为上皮细胞黏附受体 E-cadherin 的消失而被间质标记物 α -SMA 所取代。体外研究中促纤维化因子如

TGF- β 1 刺激 RTC 出现 EMT,可转化为成纤维细胞和肌成纤维细胞而产生细胞外基质、加重 RIF,因此,抑制 RTC EMT 成为延缓 RIF 的关键^[11]。SFRP5 作为 Wnt 信号通路的抑制剂,具有抗炎及抗纤维化作用,并且既往研究已证实经典的 Wnt/ β -catenin 信号通路在肾纤维化病理过程中异常激活^[12-16],推测 SFRP5 对于 RIF 的进展具有延缓和保护作用。本研究以 TGF- β 1 诱导的 RTC EMT 这一经典的 RIF 体外模型干预证实 SFRP5 可减轻 TGF- β 1 诱导的细胞 EMT 和 RIF,作用机制与抑制 Wnt/ β -catenin 信号通路相关,提示 SFRP5 对于肾纤维化的保护作用。

SFRP 家族蛋白可与 Wnt 信号通路中的特定卷曲蛋白受体具有同源性,并且可以与 Wnt 蛋白配体或卷曲蛋白受体结合,从而抑制 Wnt 通路的激活^[17]。SFRP5 在小鼠肾脏中的表达仅次于在白色脂肪组织^[18],并且根据细胞和组织病理学特征成为经典或非典型 Wnt 通路的抑制剂。早期研究发现,给予 UUO 小鼠腹腔注射重组 SFRP4 可抑制 Wnt/ β -catenin 信号通路并减轻了肾纤维化程度^[19]。最近, Yu 等^[8]发现,硫酸吡啶酚通过诱导 SFRP5 的 DNA 高甲基化,然后激活 Wnt/ β -catenin 从而促进肾纤维化。本研究发现 SFRP5 可通过直接抑制 Wnt/ β -catenin 通路来减轻肾纤维化,与上述结果一致。但是也有研究

显示建立小鼠 UUO 模型后, SFRP1 基因敲除 (SFRP1^{-/-}) 小鼠的肾纤维化程度明显比野生型小鼠更严重, 细胞分子机制发现 SFRP1 是通过非经典的 Wnt/PCP 途径而不是经典的 Wnt/ β -catenin 信号通路抑制肾损害^[20]。更新的研究显示 SFRP1 可被 MicroRNA-27a 调控直接作用于 Wnt/ β -catenin 通路而减轻肾纤维化^[21]。

在进一步的 SFRP5 调控 RIF 和 EMT 细胞机制研究中, 笔者也发现经典的 Wnt/ β -catenin 在 EMT 和 RIF 过程中异常激活: TGF- β 1 引起细胞质中稳态 β -catenin 磷酸化的下调, 导致活化后核内 β -catenin 积累增加, 进而激活下游转录靶基因, 并被 β -catenin 激活依赖的 TCF/LEF 验证。给予 SFRP5 干预后上述 Wnt/ β -catenin 通路激活的各个环节均被抑制, 并首次报道了其中 β -catenin 的 S37 位点磷酸化的变化。为验证上述 SFRP5 对于 Wnt/ β -catenin 通路抑制作用的特异性, 本研究应用针对 SFRP5 的中和抗体取消了 SFRP5 的抑制和保护作用。然而, Wnt/ β -catenin 信号通路在其中的唯一性作用以及上述过程是否涉及非经典的 Wnt 信号通路^[22], 仍需进一步研究证实。

综上所述, 本研究结果表明 SFRP5 可通过抑制 Wnt/ β -catenin 信号通路而减轻 RTC 的 EMT, 对 RIF 具有保护作用, 可能成为延缓 CKD 进展的治疗新靶点。

利益冲突 无

参考文献

- [1] Collaboration GCKD. Global, regional, and national burden of chronic kidney disease, 1990–2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017 [J]. *Lancet*, 2020, 395(10225): 709–733.
- [2] Humphreys BD. Mechanisms of renal fibrosis [J]. *Annu Rev Physiol*, 2018, 80: 309–326.
- [3] Wang HW, Shi L, Xu YP, et al. Hesperetin alleviates renal interstitial fibrosis by inhibiting tubular epithelial-mesenchymal transition *in vivo* and *in vitro* [J]. *Exp Ther Med*, 2017, 14(4): 3713–3719.
- [4] Li SS, Sun Q, Hua MR, et al. Targeting the Wnt/ β -catenin signaling pathway as a potential therapeutic strategy in renal tubulointerstitial fibrosis [J]. *Front Pharmacol*, 2021, 12: 719880.
- [5] Xie HY, Miao NJ, Xu D, et al. FoxM1 promotes Wnt/ β -catenin pathway activation and renal fibrosis via transcriptionally regulating multi-Wnts expressions [J]. *J Cell Mol Med*, 2021, 25(4): 1958–1971.
- [6] Chatani N, Kamada Y, Kizu T, et al. Secreted frizzled-related protein 5 (SFRP5) decreases hepatic stellate cell activation and liver fibrosis [J]. *Liver Int*, 2015, 35(8): 2017–2026.
- [7] Chen MH, Liu JC, Liu Y, et al. MicroRNA-199a regulates myocardial fibrosis in rats by targeting SFRP5 [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2019, 23(9): 3976–3983.
- [8] Yu YL, Guan X, Nie L, et al. DNA hypermethylation of sFRP5 contributes to indoxyl sulfate-induced renal fibrosis [J]. *J Mol Med*, 2017, 95(6): 601–613.
- [9] Webster AC, Nagler EV, Morton RL, et al. Chronic kidney disease [J]. *Lancet*, 2017, 389(10075): 1238–1252.
- [10] Djurdjaj S, Boor P. Cellular and molecular mechanisms of kidney fibrosis [J]. *Mol Aspects Med*, 2019, 65: 16–36.
- [11] Duan Y, Qiu YM, Huang XW, et al. Deletion of FHL2 in fibroblasts attenuates fibroblasts activation and kidney fibrosis via restraining TGF- β 1-induced Wnt/ β -catenin signaling [J]. *J Mol Med*, 2020, 98(2): 291–307.
- [12] Chen FT, Chen L, Li D, et al. Relaxin inhibits renal fibrosis and the epithelial-to-mesenchymal transition via the Wnt/ β -catenin signaling pathway [J]. *Ren Fail*, 2022, 44(1): 513–524.
- [13] Lin X, Zha Y, Zeng XZ, et al. Role of the Wnt/ β -catenin signaling pathway in inducing apoptosis and renal fibrosis in 5/6-nephrectomized rats [J]. *Mol Med Rep*, 2017, 15(6): 3575–3582.
- [14] Zuo YY, Liu YH. New insights into the role and mechanism of Wnt/ β -catenin signalling in kidney fibrosis [J]. *Nephrology (Carlton)*, 2018, 23 Suppl 4: 38–43.
- [15] Feng Y, Ren JF, Gui Y, et al. Wnt/ β -catenin-promoted macrophage alternative activation contributes to kidney fibrosis [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2018, 29(1): 182–193.
- [16] Yiu WH, Li Y, Lok SWY, et al. Protective role of kallistatin in renal fibrosis via modulation of Wnt/ β -catenin signaling [J]. *Clin Sci (Lond)*, 2021, 135(3): 429–446.
- [17] Claudel M, Jouzeau JY, Cailotto F. Secreted Frizzled-related proteins (sFRPs) in osteo-articular diseases: much more than simple antagonists of Wnt signaling? [J]. *FEBS J*, 2019, 286(24): 4832–4851.
- [18] Recinella L, Orlando G, Ferrante C, et al. Adipokines: new potential therapeutic target for obesity and metabolic, rheumatic, and cardiovascular diseases [J]. *Front Physiol*, 2020, 11: 578966.
- [19] Surendran K, Schiavi S, Hruska KA. Wnt-dependent beta-catenin signaling is activated after unilateral ureteral obstruction, and recombinant secreted frizzled-related protein 4 alters the progression of renal fibrosis [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2005, 16(8): 2373–2384.
- [20] Matsuyama M, Nomori A, Nakakuni K, et al. Secreted frizzled-related protein 1 (Sfrp1) regulates the progression of renal fibrosis in a mouse model of obstructive nephropathy [J]. *J Biol Chem*, 2014, 289(45): 31526–31533.
- [21] Shi MJ, Tian PP, Liu ZQ, et al. MicroRNA-27a targets Sfrp1 to induce renal fibrosis in diabetic nephropathy by activating Wnt/ β -catenin signalling [J]. *Biosci Rep*, 2020, 40(6): BSR20192794.
- [22] Sun MH, Wang WJ, Min LT, et al. Secreted frizzled-related protein 5 (SFRP5) protects ATDC5 cells against LPS-induced inflammation and apoptosis via inhibiting Wnt5a/JNK pathway [J]. *J Orthop Surg Res*, 2021, 16(1): 129.

收稿日期: 2022-10-24 修回日期: 2022-12-02 编辑: 李方