

· 论 著 ·

LY294002 对类脂 A 诱导的人冠状动脉内皮细胞缝隙连接蛋白 43 表达的影响^{*}

孔海全¹, 李明远², 巫相宏^{1△}

(1. 广西医科大学第一附属医院心血管内科, 广西 南宁 530000; 2. 右江民族医学院附属医院心血管内科, 广西 百色 533000)

[摘 要] **目的** 探讨 LY294002 对类脂 A(KLA)诱导的人冠状动脉内皮细胞(HCAEC)缝隙连接蛋白 43(Cx43)表达的影响。**方法** 用 CCK8 法检测 0、0.01、0.05、0.10、0.20 mg/L KLA 和 0、2.5、5.0、10.0、20.0 $\mu\text{mol/L}$ 磷酸肌醇 3 激酶(PI3K)特异性抑制剂——LY294002 对 HCAEC 活力的影响。将 HCAEC 采用简单随机分组法分为空白对照组(Con 组)、Toll 样受体 4(TLR4)激动组(KLA 组)、PI3K 抑制组(LY 组)和 KLA+LY 组,采用 Western Blot 法检测各组 HCAEC TLR4、PI3K、Cx43 蛋白表达水平。**结果** 0.01、0.05 mg/L KLA HCAEC 存活率与 0 mg/L 比较,2.5 $\mu\text{mol/L}$ LY294002 HCAEC 存活率与 0 $\mu\text{mol/L}$ 比较,差异均无统计学意义($P>0.05$);0.10、0.20 mg/L KLA HCAEC 存活率均明显低于 0 mg/L,5.0、10.0、20.0 $\mu\text{mol/L}$ LY294002 HCAEC 存活率均明显低于 0 $\mu\text{mol/L}$,差异均有统计学意义($P<0.05$)。KLA 组 HCAEC TLR4、PI3K、Cx43 蛋白表达水平明显高于 Con 组,LY 组 HCAEC PI3K 蛋白表达水平明显低于 Con 组,KLA+LY 组 HCAEC TLR4、PI3K、Cx43 蛋白表达水平均低于 KLA 组,差异均有统计学意义($P<0.05$);LY 组 HCAEC TLR4、Cx43 蛋白表达水平与 Con 组比较,差异均无统计学意义($P>0.05$)。**结论** LY294002 对正常培养状态下 HCAEC TLR4、Cx43 蛋白表达无显著影响。LY294002 可抑制由 KLA 诱导的 HCAEC Cx43 高表达。

[关键词] Toll 样受体 4; 磷脂酰肌醇 3 激酶; 缝隙连接蛋白 43; 人冠状动脉内皮细胞

DOI:10.3969/j.issn.1009-5519.2023.10.001

中图法分类号:R543.3

文章编号:1009-5519(2023)10-1621-05

文献标识码:A

Effects of LY294002 on expression of connexin 43 in human coronary artery endothelial cells induced by lipoid A^{*}

KONG Haiquan¹, LI Mingyuan², WU Xianghong^{1△}

(1. Department of Cardiovascular Medicine, First Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, Nanning, Guangxi 530000, China; 2. Department of Cardiovascular Medicine, Affiliated Hospital of Youjiang Medical University for Nationalities, Baise, Guangxi 533000, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the effect of LY294002 on the expression of connexin 43 (Cx43) in human coronary endothelial cells (HCAEC) induced by lipoid A (KLA). **Methods** The effects of 0, 0.01, 0.05, 0.10, 0.20 mg/L of KLA and 0, 2.5, 5.0, 10.0, 20.0 $\mu\text{mol/L}$ of PI3K specific inhibitor LY294002 on the HCAEC activity were detected by CCK8 assay. HCAEC were randomly divided into the blank control group (Con group), TLR4 agonist group (KLA group), PI3K inhibition group (LY group) and KLA+LY group. The protein expression levels of TLR4, PI3K and Cx43 in HCAEC of each group were detected by Western Blot. **Results** The survival rate of HCAEC had no statistical difference between 0.01, 0.05 mg/L KLA and 0 mg/L KLA, and between 2.5 $\mu\text{mol/L}$ LY294002 and 0 $\mu\text{mol/L}$ LY294002 ($P>0.05$), while the survival rate of HCAEC in 0.10, 0.20 mg/L KLA was significantly lower than that of 0 mg/L KLA ($P<0.05$). The survival rates of HCAEC in 5.0, 10.0, 20.0 $\mu\text{mol/L}$ LY294002 were significantly lower than those in 0 $\mu\text{mol/L}$, and the differences were statistically significant ($P<0.05$). The protein expression levels of TLR4, PI3K and Cx43 in HCAEC of the TLR4 group were significantly higher than those in the Con group, the PI3K protein expression level of HCAEC in the LY group were significantly lower than those in the Con group, the TLR, PI3K and Cx43 protein expression levels in the KLA+LY group were lower than those in the KLA group,

^{*} 基金项目:广西壮族自治区自然科学基金项目(2017GXNSFAA198113)。

作者简介:孔海全(1996—),硕士研究生在读,主要从事冠心病基础及临床研究。△ 通信作者,E-mail:whw780@126.com。

and the differences were statistically significant($P<0.05$); the TLR4 and Cx43 protein expression levels of HCAEC had no statistical difference between the LY group and Con group($P>0.05$). **Conclusion** LY294002 has no significant effect on the expression of TLR4 and Cx43 proteins of HCAEC in the normal culture status. LY294002 can inhibit the high expression of Cx43 in HCAEC induced by KLA.

[Key words] Toll-like receptor 4; Phosphoinositide3 kinase; Connexins 43; Human coronary artery endothelial cells

动脉粥样硬化(AS)是一种慢性炎症性疾病,炎症的促进和缓解机制的平衡决定了最终的临床结果^[1]。缝隙连接蛋白 43(Cx43)主要分布于内皮细胞及心肌细胞中,Cx43 介导的缝隙连接通讯对心血管系统的发育和正常功能具有重要作用^[2]。脂多糖发挥作用的主要活性成分是类脂 A(KLA),脂多糖可激活并损伤内皮细胞,引起内皮细胞功能障碍,从而导致 AS^[3]。已有研究证实了脂多糖可促进大鼠血管组织和血管内皮细胞 Cx43 表达升高^[4]。LY294002 是一种人工合成的 Class I 磷酸肌醇 3 激酶(PI3K)特异性抑制剂,可通过竞争性拮抗 Class I PI3K 中 P110 催化亚基和腺嘌呤核苷三磷酸(ATP)的结合使 PI3K 失去活性而阻断 PI3K 信号通路的活化^[5]。已有研究表明,LY294002 具有抵抗肿瘤细胞恶性生长同时抑制肿瘤血管生成^[6]、减少细胞炎症因子的产生^[7]等作用。本研究观察了 PI3K 通路特异性抑制剂——LY294002 对 KLA 刺激的人冠状动脉内皮细胞(HCAEC)Toll 样受体 4(TLR4)、PI3K 和 Cx43 蛋白及 mRNA 表达的影响,探讨了 LY294002 通过抑制 TLR4/PI3K 信号通路对 KLA 诱导内皮细胞炎性损伤反应的影响,旨在为预防 AS 提供新思路和方法。

1 材料与方法

1.1 材料 HCAEC 细胞株、内皮细胞培养基(ECM)均购自美国 Scienccell 公司,LY294002 购自美国 CST 公司,TLR4 激动剂——KLA 购自美国 Avanti Polar Lipids 公司,CCK8 法试剂盒购自中国美仑公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 原代 HCAEC 为中国 Procell 普诺赛公司产品(货号 CP H087),通过广西卓一代理商购买。细胞培养基成分为 100 μg/mL 链霉素、100 U/mL 青霉素、10%胎牛血清和 100 U/mL 内皮细胞生长添加剂。细胞培养环境保持在 37℃、5%二氧化碳条件下,1~3 d 换液 1 次,待细胞密度至 80%以上即可传代,选取同代细胞进行实验。

1.2.2 CCK8 法检测细胞活力

1.2.2.1 检测 KLA 对 HCAEC 活力的影响 根据加入 KLA 的不同质量浓度分为 5 组,即 0、0.01、0.05、0.10、0.20 mg/L 组,每个质量浓度设 5 个复孔。分别在培养孔中加入细胞培养基和相应质量浓度的 KLA,置于 37℃、5%二氧化碳培养箱中 24 h,

然后终止培养,每孔加入 10 μL CCK8 溶液,在培养箱中培养 4 h,使用酶标仪读取吸光度(A)值。

1.2.2.2 检测 LY294002 对 HCAEC 活力的影响 采用与 1.2.2.1 项同样的方法检测 0、2.5、5.0、10.0、20.0 μmol/L LY294002 对 HCAEC 活力的影响。为防止不同代数细胞活力的误差,使用同一代数 HCAEC 进行实验。根据细胞活力确定后续 KLA 和 LY294002 的最适实验质量浓度。

1.2.3 分组及干预 将 HCAEC 分为以下 4 组进行后续 Western Blot 实验,每项实验均独立重复 3 次以上。(1)空白对照组(Con 组)不进行其他任何处理,使用基础培养基正常培养 HCAEC 24 h。(2)TLR4 激动组(KLA 组)使用含 KLA 的基础培养基培养 HCAEC 24 h。(3)PI3K 抑制组(LY 组)使用含 LY294002 的基础培养基培养 HCAEC 24 h。(4)KLA+LY 组先加入 LY294002 预处理 4 h 后加入 KLA 培养 HCAEC 24 h。

1.2.4 Western Blot 法检测 HCAEC TLR4、PI3K、Cx43 蛋白表达 将细胞裂解液加入细胞中并在冰上裂解细胞 10 min,离心后收集上清液;采用 BCA 法测定蛋白表达水平。每孔 40 μg 蛋白,在聚丙烯酰胺凝胶电泳处理后转膜,封闭,加入一抗孵育过夜,第 2 天加入二抗,孵育 1 h 后进行显影处理,以甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)作为内参,使用 Odyssey 双色红外激光成像系统扫描,以目的蛋白条带灰度值与 GAPDH 校正后的灰度值比值作为其相对表达水平。

1.3 统计学处理 应用 SPSS26.0 统计软件进行数据分析,符合正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用独立样本 *t* 检验、SNK 检验、Welch 检验等。采用双侧检验。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 不同质量浓度 KLA、LY294002 HCAEC 存活率比较 0.01、0.05 mg/L KLA HCAEC 存活率[分别为(99.30±2.54)%、(97.06±2.96)%]与 0 mg/L [(100.02±1.79)%]比较,差异均无统计学意义($t=0.524、1.918, P=0.614、0.091$); 0.10、0.20 mg/L KLA HCAEC 存活率[分别为(88.04±3.07)%、(67.98±3.57)%]均明显低于 0 mg/L,差异均有统计学意义($t=7.529、17.950, P$ 均 <0.001)。最终选择 KLA 0.05 mg/L 作为对 HCAEC 炎性刺激的工

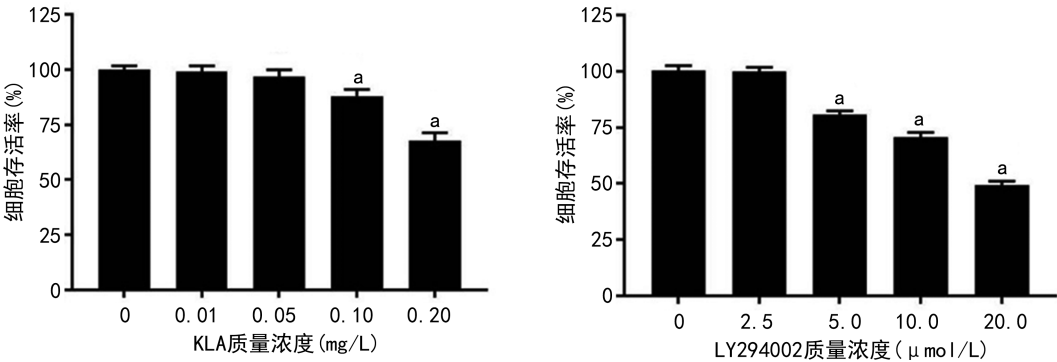
作质量浓度。2.5 $\mu\text{mol/L}$ LY294002 HCAEC 存活率 $[(100.16 \pm 1.73)\%]$ 与 0 $\mu\text{mol/L}$ $[(100.52 \pm 2.17)\%]$ 比较,差异均无统计学意义($t=0.284, P=0.784$);5.0、10.0、20.0 $\mu\text{mol/L}$ LY294002 HCAEC 存活率[分别为 $(80.85 \pm 1.74)\%$ 、 $(70.92 \pm 2.09)\%$ 、 $(49.18 \pm 1.76)\%$]均明显低于 0 $\mu\text{mol/L}$,差异均有统计学意义($t=15.820、21.989、41.112, P$ 均 <0.001)。最终选择 2.5 $\mu\text{mol/L}$ 作为后续实验的处理质量浓度。不同质量浓度 KLA、LY294002 对 HCAEC 活力的影响见图 1。

2.2 各组 HCAEC TLR4、PI3K、Cx43 蛋白表达水平比较 KLA 组 HCAEC TLR4、PI3K、Cx43 蛋白表达水平均明显高于 Con 组, KLA+LY 组 HCAEC

TLR4、PI3K、Cx43 蛋白表达水平明显低于 KLA 组, LY 组 HCAEC PI3K 蛋白表达水平明显低于 Con 组, 差异均有统计学意义($P<0.05$)。LY 组 HCAEC TLR4、Cx43 蛋白表达水平与 Con 组比较, 差异均无统计学意义($P>0.05$)。见表 1, 图 2、3。

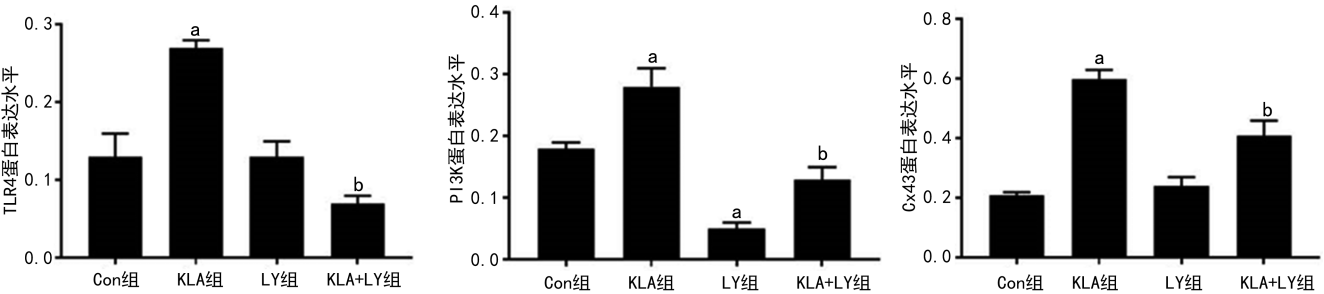
表 1 各组 HCAEC TLR4、PI3K、Cx43 蛋白表达水平比较($\bar{x} \pm s$)				
组别	<i>n</i>	TLR4	PI3K	Cx43
Con 组	4	0.13 $\pm$ 0.03	0.18 $\pm$ 0.01	0.21 $\pm$ 0.01
KLA 组	4	0.27 $\pm$ 0.01 ^a	0.28 $\pm$ 0.03 ^a	0.60 $\pm$ 0.03 ^a
LY 组	4	0.13 $\pm$ 0.02	0.05 $\pm$ 0.01 ^a	0.24 $\pm$ 0.03
KLA+LY 组	4	0.07 $\pm$ 0.01 ^b	0.13 $\pm$ 0.02 ^b	0.41 $\pm$ 0.05 ^b

注:与 Con 组比较,^a $P<0.05$;与 KLA 组比较,^b $P<0.05$ 。



注:与 0 mg/L KLA、0 $\mu\text{mol/L}$ LY294002 比较,^a $P<0.05$ 。

图 1 不同质量浓度 KLA、LY294002 对 HCAEC 活力的影响



注:与 Con 组比较,^a $P<0.05$;与 KLA 组比较,^b $P<0.05$ 。

图 2 各组 HCAEC TLR4、PI3K、Cx43 蛋白表达水平比较

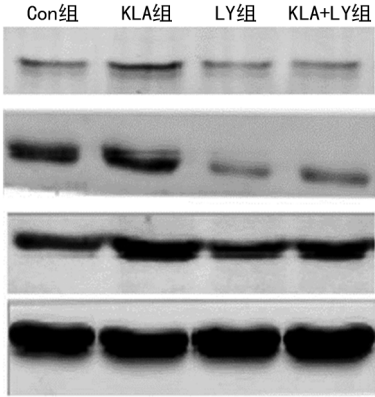


图 3 各组 HCAEC TLR4、PI3K、Cx43 蛋白表达水平比较

3 讨论

近年来,AS 逐渐被认为是脂质驱动的、慢性、低级别的动脉壁炎症性疾病^[8],抗炎越来越被认为是进一步降低 AS 性心血管疾病残余风险的有吸引力的策略。TLR4 信号通路可通过多途径参与 AS 的进程,并参与一系列与 AS 相关的细胞因子、炎症因子的合成与释放等环节^[9]。LI 等^[10]发现,Corilagin 可通过抑制单核/巨噬细胞 TLR4 信号通路,减少促炎性细胞因子的释放,改善 AS 斑块的发展。WAHID 等^[11]发现,TLR4 是炎症反应的关键上游调节因子,可驱动子宫激活和控制分娩时机,干预 TLR4 信号可能对有早产风险或足月后妊娠的妇女有治疗作用。有研究

发现,TLR4 激动剂可通过 Cx43 半通道在巨噬细胞中触发 ATP 的释放,从而影响脓毒症患者的预后^[12]。另外有研究表明,TLR4 通路激活后 Cx43 表达明显增加,且呈剂量和时间依赖性^[13]。本研究结果显示,使用 KLA 刺激 HCAEC 后可激活其 TLR4 信号通路;而且 KLA 至少部分通过激活 TLR4 相关的 PI3K 通路上调 Cx43 的表达,与既往研究结果相似。

PI3K 信号通路的激活可使细胞产生大量的炎症细胞因子,在机体炎症反应和 AS 的发展与消退中发挥着重要作用^[14]。有研究表明,抑制 PI3K、蛋白激酶 B (Akt)、肿瘤坏死因子- α mRNA 表达对高脂饮食喂养的 ApoE 基因敲除小鼠具有抗 AS 的作用^[15]。EISENREICH 等^[16]发现,使用 PI3K 抑制剂抑制 PI3K 信号通路的传导可抑制 AS 的形成,减少斑块面积^[17]。既往研究表明,PI3K/Akt 信号通路参与了高果糖饲料诱导 AS 的发生、发展^[18]。表明似乎抑制 PI3K 信号通路对抑制 AS 具有积极的作用。本研究结果显示,PI3K 抑制剂——LY294002 能明显抑制 KLA 诱导的 TLR4、PI3K、Cx43 的表达,但并不影响正常状态下 HCAEC TLR4、Cx43 的表达,这一发现可能为将来 LY294002 的使用范围提供方向。

Cx43 的表达调控了内皮细胞的增殖、迁移和血管生成,抑制 Cx43 可降低细胞增殖和血管生成^[19]。有研究发现,AS 的冠心病患者 Cx43、Cx46 的表达均显著上调^[20]。有学者发现,小鼠 Cx43 的普遍减少对 AS 病变的进展和组成具有有益作用^[21]。有研究表明,银杏通过抑制 Cx43 的表达抑制 AS 进展^[22]。有研究发现,肿瘤坏死因子- α 通过下调 Cx43 诱导平滑肌细胞凋亡,促进 AS 斑块的稳定。既往研究表明,降低 Cx43 可通过减少炎症反应和减少平滑肌细胞迁移和增殖限制急性血管损伤后新内膜的形成^[23],血管紧张素 II 上调 Cx43 促进人肺动脉平滑肌细胞的增殖和迁移^[24],无翅型 MMTV 整合位点家族成员 3A (Wnt3a)促进血管平滑肌细胞的收缩和分泌表型与 Cx43 的表达增加有关^[25]。由此看来,Cx43 在平滑肌细胞中似乎发挥着重要的作用。在 AS 易感的低密度脂蛋白受体缺陷小鼠中 Cx43 表达的整体降低可减慢 AS 斑块形成的进程^[25]。既往研究表明,下调 Cx43 表达可显著降低单核细胞-内皮细胞黏附^[26],而单核细胞-内皮黏附是 AS 发展的关键因素之一。另一方面值得注意的是,表达 Cx43 的不同细胞类型(平滑肌细胞、内皮细胞等)在 AS 发生中的确切作用仍有待于证实,但似乎减少血管 Cx43 表达的策略可能对 AS 具有保护作用^[27]。提示下调 Cx43 似乎是抑制 AS 的重要途径之一。本研究结果显示,LY294002 可抑制由 KLA 诱导的 HCAEC Cx43 高表达,表明 LY294002 在治疗 AS 方面也许具有不小的潜力。

总之,使用 LY294002 可抑制由 KLA 诱导的 HCAEC Cx43 高表达,其机制至少部分与抑制 TLR4/PI3K 信号通路有关,为此 LY294002 很可能成为治疗 AS 的一个重要药物,可能为治疗 AS 提供新的方案和策略。

参考文献

[1] BÄCK M, YURDAGUL A J, TABAS I, et al. Inflammation and its resolution in atherosclerosis: mediators and therapeutic opportunities [J]. Nat Rev Cardiol, 2019, 16(7): 389-406.

[2] JOHNSON A M, ROACH J P, HU A N, et al. Connexin 43 gap junctions contribute to brain endothelial barrier hyperpermeability in familial cerebral cavernous malformations type III by modulating tight junction structure [J]. FASEB J, 2018, 32(5): 2615-2629.

[3] 王燕, 补蔚萍, 谢宏, 等. 大豆异黄酮对过氧化氢及脂多糖诱导的血管内皮细胞损伤保护机制的实验研究 [J]. 中华心血管病杂志, 2014, 42(2): 150-155.

[4] 郑鹏飞, 巫相宏, 黄文, 等. 盐酸法舒地尔对脂多糖诱导的大鼠血管内皮功能障碍的改善作用及机制 [J]. 中华心血管病杂志, 2017, 45(2): 142-147.

[5] YANG J, NIE J, MA X L, et al. Targeting PI3K in cancer: mechanisms and advances in clinical trials [J]. Mol Cancer, 2019, 18(1): 26.

[6] MOSCHETTA M G, LEONEL C, MASCHIO-SIGNORINI L B, et al. Evaluation of angiogenesis process after metformin and LY294002 treatment in mammary tumor [J]. Anticancer Agents Med Chem, 2019, 19(5): 655-666.

[7] 黄萍. PI3K 泛抑制剂对 IL-25 诱导的过敏原非依赖性哮喘样症状的抑制作用研究 [D]. 北京: 首都医科大学, 2016.

[8] LI B, LI W, LI X, et al. Inflammation: a novel therapeutic target/direction in atherosclerosis [J]. Curr Pharm Des, 2017, 23(8): 1216-1227.

[9] ROSHAN M H, TAMBO A, PACE N P. The role of TLR2, TLR4, and TLR9 in the pathogenesis of atherosclerosis [J]. Int J Inflam, 2016, 2016: 1532832.

[10] LI Y Q, WANG Y J, CHEN Y F, et al. Corilagin ameliorates atherosclerosis in peripheral artery disease via the Toll-like receptor-4 signaling pathway in vitro and in vivo [J]. Front Im-

- munol, 2020, 11: 1611.
- [11] WAHID H H, DORIAN C L, CHIN P Y, et al. Toll-like receptor 4 is an essential upstream regulator of on-time parturition and perinatal viability in mice[J]. *Endocrinology*, 2015, 156(10): 3828-3841.
- [12] DOSCH M, ZINDEL J, JEBBAWI F, et al. Connexin-43-dependent ATP release mediates macrophage activation during sepsis [J]. *Elife*, 2019, 8: e42670.
- [13] QIN J L, ZHANG G X, ZHANG X Y, et al. TLR-Activated gap junction channels protect mice against bacterial infection through extracellular UDP release[J]. *J Immunol*, 2016, 196(4): 1790-1798.
- [14] ZHAO Y Y, QIAN Y J, SUN Z, et al. Role of PI3K in the progression and regression of atherosclerosis[J]. *Front Pharmacol*, 2021, 12: 632378.
- [15] KANG Q F, LIU W H, LIU H X, et al. Effect of compound chuanxiong capsule on inflammatory reaction and PI3K/Akt/NF- κ B signaling pathway in atherosclerosis[J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2015, 2015: 584596.
- [16] EISENREICH A, RAUCH U. PI3K inhibitors in cardiovascular disease[J]. *Cardiovasc Ther*, 2011, 29(1): 29-36.
- [17] LU X L, ZHAO C H, YAO X L, et al. Quercetin attenuates high fructose feeding-induced atherosclerosis by suppressing inflammation and apoptosis via ROS-regulated PI3K/AKT signaling pathway[J]. *Biomed Pharmacother*, 2017, 85: 658-671.
- [18] ARSHAD M, CONZELMANN C, RIAZ M A, et al. Inhibition of Cx43 attenuates ERK1/2 activation, enhances the expression of Cav-1 and suppresses cell proliferation [J]. *Int J Mol Med*, 2018, 42(5): 2811-2818.
- [19] CHEN L N, CHEN Z L, GE M H, et al. Monocytic cell junction proteins serve important roles in atherosclerosis via the endoglin pathway[J]. *Mol Med Rep*, 2017, 16(5): 6750-6756.
- [20] MOREL S, CHANSON M, NGUYEN T D, et al. Titration of the gap junction protein Connexin 43 reduces atherogenesis [J]. *Thromb Haemost*, 2014, 112(2): 390-401.
- [21] WEI J M, WANG X, GONG H, et al. Ginkgo suppresses atherosclerosis through downregulating the expression of connexin 43 in rabbits[J]. *Arch Med Sci*, 2013, 9(2): 340-346.
- [22] CHADJICHRISTOS C E, MATTER C M, ROTH I, et al. Reduced connexin 43 expression limits neointima formation after balloon distension injury in hypercholesterolemic mice[J]. *Circulation*, 2006, 113(24): 2835-2843.
- [23] 贾奇花, 黎玲, 宋文杰, 等. 血管紧张素 II 上调连接子蛋白 43(Cx43)促进人肺动脉平滑肌细胞的增殖和迁移[J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2020, 36(7): 616-621.
- [24] CARTHY J M, LUO Z, MCMANUS B M. WNT3A induces a contractile and secretory phenotype in cultured vascular smooth muscle cells that is associated with increased gap junction communication[J]. *Lab Invest*, 2012, 92(2): 246-255.
- [25] KWAK B R, VEILLARD N, PELLI G, et al. Reduced connexin 43 expression inhibits atherosclerotic lesion formation in low-density lipoprotein receptor-deficient mice[J]. *Circulation*, 2003, 107(7): 1033-1039.
- [26] YUAN D, SUN G, ZHANG R, et al. Connexin 43 expressed in endothelial cells modulates monocyte-endothelial adhesion by regulating cell adhesion proteins[J]. *Mol Med Rep*, 2015, 12(5): 7146-7152.
- [27] MOREL S, KWAK B R. Roles of connexins in atherosclerosis and ischemia-reperfusion injury [J]. *Curr Pharm Biotechnol*, 2012, 13(1): 17-26.

(收稿日期: 2022-08-16 修回日期: 2023-01-23)