

DOI:10.13350/j.cjpb.230803

• 论著 •

三源重组 H9N2 禽流感病毒血凝素蛋白兔 多克隆抗体的制备及鉴定^{*}

程晴,梁志鹏,何杰珩,池仕红,袁生,郭锦玥,黄淑坚,温峰^{**}

(佛山科学技术学院生命科学与工程学院,广东佛山 528225)

【摘要】 目的 表达一株华南地区新发的三源重组 H9N2 亚型禽流感病毒(Avian influenza virus,AIV)的血凝素(HA)蛋白,并制备多克隆抗体。 **方法** 通过 RT-PCR 技术扩增华南地区分离的 H9N2 亚型 AIV HA 基因,并克隆至 pET-32a 载体。将重组 pET-32a-HA 质粒转化到 *E. coli* Rosetta(DE3)感受态细胞中用 IPTG 诱导表达,通过 SDS-PAGE 及 Western blot 鉴定 HA 蛋白的表达,并优化诱导表达的 IPTG 浓度、时间及温度,提高表达效率。用纯化的重组蛋白免疫新西兰大白兔,制备多克隆抗体,通过 Western blot、间接免疫荧光和 ELISA 检测多克隆抗体的特异性和效价,采用 HI 试验测定其血凝抑制效价。 **结果** PCR 扩增出 HA 基因,大小约为 1 700 bp。双酶切及测序结果表明,成功构建 pET-32a-HA 表达载体。经 SDS-PAGE 及 Western blot 验证该蛋白分子质量约 79 ku,与预期一致,成功表达 HA 基因。对诱导条件进行优化,HA 蛋白在 28 ℃、IPTG 终浓度为 0.8 mmol/L 诱导 5 h 表达量最高。制备的多克隆抗体可与 HA 蛋白特异性结合,其血凝抑制效价为 1:128,间接 ELISA 效价为 1:1 638 400。 **结论** 表达的 pET-32a-HA 蛋白具有免疫原性,制备的 HA 多克隆抗体具有良好特异性,且效价高,为建立 ELISA 检测方法以及疫苗的研制奠定了基础。

【关键词】 禽流感病毒(AIV);H9N2 亚型;HA 蛋白;原核表达;多克隆抗体

【中图分类号】 S852.65

【文献标识码】 A

【文章编号】 1673-5234(2023)08-0881-05

[*Journal of Pathogen Biology*. 2023 Aug;18(8):881-885.]

Preparation and preliminary application of rabbit polyclonal antibody against hemagglutinin protein of triple reassortant H9N2 avian influenza virus

CHENG Qing¹, LIANG Zhipeng¹, CHI Shihong¹, YUAN Sheng¹, GUO Jinyue¹, HUANG Shujian¹, WEN Feng¹ (*College of Life Science and Engineering, Foshan University, Foshan 528225, Guangdong China*)^{***}

【Abstract】 Objective The aim of this study was to express the hemagglutinin (HA) protein of a newly emerged triple reassortant H9N2 subtype avian influenza virus (AIV) from south China and prepare polyclonal antibodies. **Methods** The HA gene of the H9N2 subtype AIV isolated from South China was amplified by RT-PCR and cloned into the pET-32a vector. The recombinant pET-32a-HA plasmid was transformed into *E. coli* Rosetta (DE3) competent cells for IPTG-induced expression. The expression of HA protein was confirmed by SDS-PAGE and Western-blotting, and the IPTG concentration, time and temperature of induction were further optimized to improve the expression efficiency. Polyclonal antibodies were prepared by immunizing New Zealand white rabbits with the purified recombinant protein. The specificity and titer of the polyclonal antibodies were evaluated by Western-blotting, indirect immunofluorescence and ELISA, and the hemagglutination inhibition titer was determined. **Results** The HA gene was successfully amplified by PCR, with a size of approximately 1 700 bp. Double enzyme digestion and sequencing confirmed the successful construction of the pET-32a-HA expression vector. SDS-PAGE and Western blot analysis revealed that the molecular weight of the expressed protein was approximately 79 ku, consistent with the expected size, indicating successful expression of the HA gene. Optimal induction conditions for HA protein expression were determined as 28 ℃, 0.8 mmol/L IPTG concentration, and 5 hours of induction. The prepared polyclonal antibodies specifically bound to the HA protein, with a hemagglutination inhibitory titer of 1:128 and an indirect ELISA titer of 1:1 638 400. **Conclusion** In conclusion, the pET-32a-HA protein expressed in this study has good immunogenicity, and the prepared HA polyclonal antibodies showed good specificity and high titer, laying a foundation for the development of ELISA detection methods and vaccines.

^{*} **【基金项目】** 国家自然科学基金项目(No. 32002320);广东省教育厅科研项目(No. 2022KTSCX124);广东省基础与应用基础研究基金项目(No. 2022A1515012462, 2020A1515010116);广东大学生科技创新培育专项资金资助项目(No. pdjh2023b0547);广州市增城区创业领军团队项目(No. 202101001);佛山科学技术学院实验室开放创新基金项目(KFCX2023-B30)。

^{**} **【通讯作者】** 温峰, E-mail: wenf@fosu.edu.cn

【作者简介】 程晴(1996-),女,广东湛江人,在读硕士,主要从事分子病毒学方面的研究。E-mail:1445796805@qq.com

【Key words】 Avian influenza virus (AIV); H9N2 subtype; HA protein; prokaryotic expression; polyclonal antibody

禽流感病毒(Avian influenza virus, AIV)是危害严重的人兽共患病病毒之一,隶属正粘病毒科(Orthomyxoviridae),甲型流感病毒属^[1]。AIV基因组由8个分节段的单股负链RNA构成,分别为PB2、PB1、PA、HA、NA、NP、M和NS^[2]。根据致病性AIV可分为高致病性AIV(Highly pathogenic avian influenza virus, HPAIV)和低致病性AIV(Low pathogenic avian influenza virus, LPAIV)^[3]。H9N2亚型AIV是家禽中传播广泛且危害较大的一种LPAIV^[4]。虽然H9N2亚型AIV感染家禽通常表现有呼吸道轻微症状及产蛋下降等^[5],但其引发的继发性感染可造成更严重的发病率和死亡率^[6]。H9N2亚型AIV除了对家禽健康造成威胁外,目前还报告过多例人感染H9N2亚型AIV病例^[7],并且H9N2亚型AIV可为H5N1、H5N6、H7N9及H10N8等已报道感染人类的可造成严重呼吸道症状的AIV提供内部基因^[8-10]。因此,H9N2亚型AIV的防控具有重大的公共卫生意义。

血凝素蛋白(Hemagglutinin, HA)是流感病毒表面主要的抗原蛋白质之一,有唾液酸结合位点,可促使病毒附着于受体细胞^[11]。并且HA基因突变易导致抗原漂移和抗原转变,引起季节性流感的暴发,给我国畜牧养殖业产业造成巨大损失^[12]。因此,AIV的HA蛋白在防控监测中具有重要意义。本研究根据前期分离得到的1株三源重组H9N2亚型AIV(由G1、Y280及F98系病毒重组)^[13]的HA基因序列,构建PET 32a-HA原核表达载体,于*E. coli* Rosetta(DE3)感受态细胞中进行表达,并优化PET 32a-HA蛋白表达的IPTG最佳诱导浓度、时间及温度。同时制备HA兔多抗,H9N2亚型AIV的鉴定及相关疫苗的研制奠定基础。

材料与方 法

1 材料

1.1 毒株,细胞,载体及质粒 H9N2亚型禽流感病毒株A/chicken/Baise/0701/2019(H9N2)(简称BS/19)^[13],*E. coli* Top 10感受态细胞,pMD 18T和pET-32a(+)载体均由实验室保存;*E. coli* Rosetta(DE3)购于北京全式金生物公司。

1.2 主要试剂 氨苄青霉素(AMP+),PVDF转印膜,kcl及流感病毒受体破坏酶(Receptor destroying enzyme,RDE)均由实验室保存;T4连接酶,*Bam* H I和*Xho* I内切酶,购于中国NEB公司;高保真酶,DNA及质粒纯化试剂购于自赛默飞世尔科技公司;

DNA marker DL 5000/10000购自艾科瑞生物工程有限公司;考马斯亮蓝快速染色液,蛋白分子质量标准,SDS-PAGE蛋白上样缓冲液(5×)及HRP标记山羊抗小鼠IgG(H+L)二抗购自上海碧云天生物技术有限公司;His-Tag Mouse Monoclonal Antibody一抗购自中国Abways公司。

1.3 实验动物 80日龄雌性新西兰大白兔购于广东省医学动物中心。

2 方法

2.1 HA基因PCR扩增引物的设计与合成 根据BS/19 HA基因序列设计并合成HA基因引物,序列5'端和3'端分别引入*Bam* H I和*Xho* I酶切位点(下划线部分)。引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。上游引物H9N2-HA-F: 5'-GGCTGATATCGGATCCATGGAGACAGTATCACTAATAA CT-3';下游引物H9N2-HA-R: 5'-CCGCAAGCTTCTCGAGTTATATACAAATGTTGCATCTGCA-3'。

2.2 pET-32a-HA重组原核表达载体的构建 以PHW 2000 BS/19 HA为模板PCR扩增HA基因。PCR体系:PHW 2000 BS/19 HA质粒1 μL,上、下游引物各1.25 μL(10 μmol/L),mix 12.5 μL,ddH₂O 9 μL。扩增条件:98℃预变性30 s;98℃变性10 s,58℃退火30 s,72℃延伸2 min,重复35个循环;72℃延伸10 min。扩增产物经1%琼脂糖凝胶电泳验证。回收DNA片段,4℃过夜连接于pMD 18T载体,并转化至TOP 10感受态细胞,构建pMD 18T-HA载体。pMD 18T-HA与pET 32a(+)载体分别用*Bam* H I和*Xho* I双酶切,利用T4连接酶16℃定向连接3 h,构建原核重组表达载体pET-32a-HA,并委托生工公司测序。将pET-32a-HA质粒转化至表达感受态*E. coli* Rosetta(DE3),构建pET-32a-HA/Rosetta原核表达菌株。

2.3 pET-32a-HA重组蛋白的诱导表达及Western blot验证 将重组pET-32a-HA Rosetta阳性菌液37℃、220 r/min恒温摇床过夜培养,再以1:100比例稀释至含有抗性(AMP+)的培养基中继续培养至A₆₀₀值为0.6,加入1 mmol/L(终浓度)的IPTG诱导表达5 h,并设置pET-32a(+)空载对照组。收集并处理菌体,经SDS-PAGE电泳分析后转印至PVDF膜,使用5%脱脂奶粉室温封闭3 h,His-tag抗体4℃过夜孵育,二抗孵育2 h,然后将PVDF膜放入化学发光成像仪中显色。

2.4 pET-32a-HA/Rosetta原核表达条件的优化

将重组 pET-32a-HA/Rosetta 菌株以 1 : 100 比例接种于含有抗性(AMP⁺)的培养基中,37 ℃ 摇床培养至 A₆₀₀ 值为 0.6,对 IPTG 浓度(0.2、0.4、0.6、0.8、1.0、1.2、1.4 和 1.6 mmol/L)、诱导时间(1、2、3、4、5、6、7、8 h)及温度(18、28、37 ℃)进行优化。收集并处理蛋白样品,通过 SDS-PAGE 分析诱导目的蛋白表达的最佳 IPTG 浓度、时间及温度。

2.5 蛋白纯化及浓缩 以适宜的条件大量诱导表达目的蛋白。超声破碎菌体后进行 SDS-PAGE。将蛋白胶置于 0.3 mol/L KCl 溶液中显示出白色条带,对应切下目的条带,磨碎胶体并加入适宜 PBS,于 -80 ℃ 冻融,离心,取上清,在 PEG20000 中浓缩至目的体积,加入 1% PMSF,保存至 -80 ℃。

2.6 pET-32a-HA 兔多克隆抗体制备 按 1 mg/只剂量的目的蛋白与弗式佐剂以 1 : 1 体积乳化,经皮下多点注射免疫新西兰大白兔,共免疫 3 次,每次间隔 14 d。第一次免疫采用弗式完全佐剂,第二、三次免疫采用弗式不完全佐剂。末次免后 7 d 采血,分离血清,分装后于 -80 ℃ 冻存。分别以纯化的 pET-32a-HA 蛋白和 BS/19 H9N2 病毒为抗原,以制备的 HA 兔抗血清为一抗进行 Western blot 和间接免疫荧光试验(Indirect immunofluorescence assay,IFA),检测抗体活性。用 BS/19 H9N2 病毒制备 4 单位抗原,HA 抗血清经 RDE 处理后进行 HI 试验,检测抗体的血凝抑制效价。同时以 1 μg/mL HA 蛋白作为包被抗原,采用 ELISA 检测兔抗 HA 血清抗体效价。

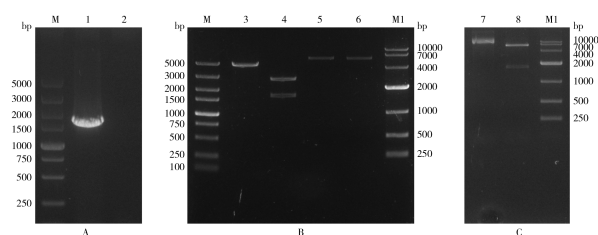
结 果

1 pET-32a-HA 重组载体的构建及鉴定

以 PHW200 HA 质粒为模板 PCR 扩增 HA 基因片段,经核酸电泳验证,目的片段约为 1 700 bp (图 1A),与预期相符。切下含目的片段的核酸胶,回收目的基因片段,连接至 pMD 18T 载体,构建 pMD 18T-HA 质粒并大量克隆。取 pMD 18T-HA 用 *Bam*H I 和 *Xho* I 双酶切,获得约 1 700 bp 的酶切目的片段(图 1B)。pMD 18T-HA 与 pET-32a(+)载体分别用 *Bam*H I 和 *Xho* I 双酶切后利用 T4 连接酶 16 ℃ 定向连接 3 h,构建原核重组表达载体 pET-32a-HA。pET-32a-HA 经双酶切,得到两条片段,分别为目的基因片段和载体片段(图 1C)。重组载体构建正确。

2 重组蛋白的诱导表达及 Western blot 验证

SDS-PAGE 分析 PET 32a-HA 经 IPTG 诱导表达的蛋白分子质量介于 70~100 ku 之间(图 2A),与蛋白的理论值 79 ku 相符。经 Western blot 验证,表达的目的蛋白能被相应抗体识别,反应条带位于 79 ku 处(图 2B)。

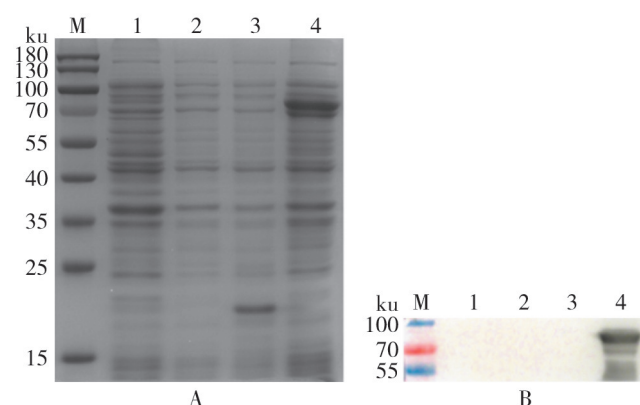


M DNA 标志物(DL 5000) 1 PCR 扩增 HA 片段 2 PCR 扩增阴性对照 3 HA-18T *Bam*H I 单酶切 4 HA-18T *Bam*H I 和 *Xho* I 双酶切 5 pET-32a 空载体 *Bam*H I 单酶切 6 pET-32a *Bam*H I 和 *Xho* I 双酶切 7 pET-32a-HA *Bam*H I 单酶切 8 pET-32a-HA *Bam*H I 和 *Xho* I 双酶切 M1 DNA 标志物(DL 10000)

图 1 PET 32 a-HA 载体的构建及鉴定

M DNA marker DL5000 1 HA 2 Negative control 3 *Bam*H I digestion of HA-18T 4 *Bam*H I and *Xho* I digestion of HA-18T 5 *Bam*H I digestion of pET-32a 6 *Bam*H I and *Xho* I digestion of pET-32a 7 *Bam*H I digestion of pET-32a-HA 8 *Bam*H I and *Xho* I digestion of pET-32a-HA M1 DNA marker DL10000

Fig. 1 Construction of PET 32-HA vector



M 蛋白分子质量标准 1 pET-32a 未诱导 2 pET-32a-HA 未诱导 3 pET-32a IPTG 诱导 5 h 4 pET-32a-HA IPTG 诱导 5 h

图 2 重组蛋白表达的 SDS-PAGE(A)和 Western blot(B)分析

M Protein Marker 1 pET-32a was not induced 2 pET-32a-HA was not induced 3 Induction of pET-32a 4 Induction of pET-32a-HA

Fig. 2 Expression of recombinant protein

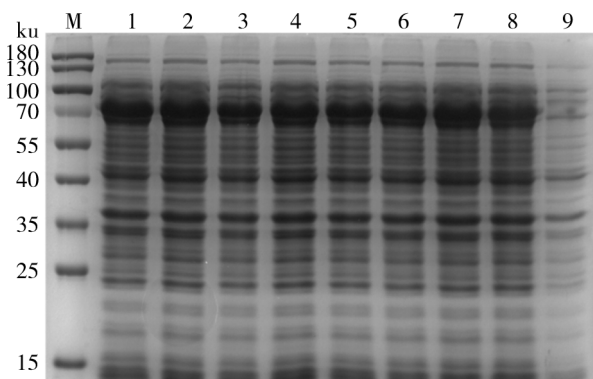
3 重组蛋白表达条件的优化

对诱导重组蛋白表达的 IPTG 浓度、时间和温度进行优化,结果见图 3~图 5。确定 28 ℃、IPTG 终浓 0.8 mmol/L 诱导 5 h 为重组蛋白的最佳诱导表达条件。

4 HA 兔抗体血清验证

分别以纯化的 HA 蛋白及 H9N2 亚型病毒为抗原,以倍比稀释的 HA 兔多克隆血清为一抗进行 Western blot,结果如图 6。HA 兔多克隆血清能与抗原结合的最大稀释度为 10⁴ 倍。H9N2 亚型 AIV 感染 MDCK 细胞 24 h 后进行 IFA 试验,制备的 HA 兔多克隆血清以 1 : 1 600 稀释仍能产生绿色荧光,而健康兔血清对照无绿色荧光(图 7)。HA 兔多克隆血清经 RBD 37 ℃ 处理 18 h 后与 BS/19 H9N2 病毒制备

的4单位抗原室温共孵育30 min,每孔加入0.5%鸡红细胞,再室温孵育30 min,测得HI效价为1:128。经间接ELISA检测,HA兔多克隆血清效价为1:1 638 400(图8)。

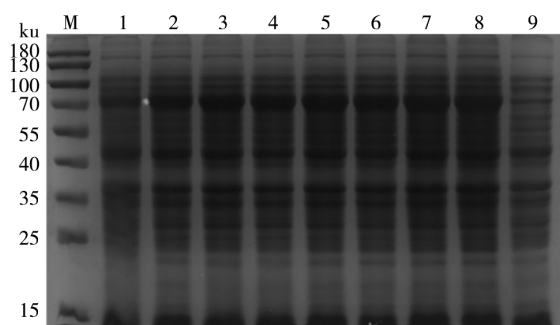


M 蛋白分子质量标准 1~8 IPTG 浓度依此为 0.2、0.4、0.6、0.8、1.0、1.2、1.4 和 1.6 mmol/L 9 空白对照

图3 重组蛋白表达诱导剂 IPTG 浓度的优化

M Protein Marker 1-8 IPTG concentration of 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0, 1.2, 1.4 and 1.6 mmol/L 9 Blank control

Fig. 3 Induction of IPTG at different concentrations

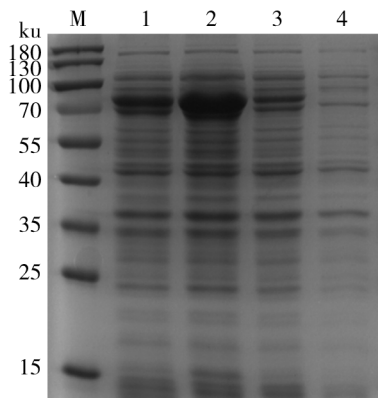


M 蛋白分子质量标准 1~8 IPTG 诱导时间依次为 1、2、3、4、5、6、7 和 8 h 9 空白对照

图4 IPTG 诱导时间的优化

M Protein Marker 1-8 The induction time of 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 and 8 h 9 Blank control

Fig. 4 The induction time

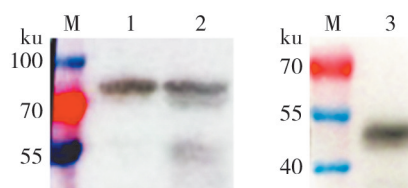


M 蛋白分子质量标准 1 诱导温度 18 °C 2 诱导温度 28 °C 3 诱导温度 37 °C 4 空白对照

图5 IPTG 诱导温度的优化

M Protein Marker 1 18 °C 2 28 °C 3 37 °C 4 Blank control

Fig. 5 Expression induced by low temperature



M 蛋白分子质量标准 1 HA 抗体与纯化重组蛋白反应条带 2 HA 抗体与未纯化重组蛋白反应条带 3 HA 抗体与 H9N2 亚型 AIV 抗原反应条带

图6 多克隆抗体的 Western blot 鉴定

M Protein Marker 1 The antigen is purified protein 2 The antigen is unpurified protein 3 The antigen is H9N2 subtype AIV

Fig. 6 Western-blotting identification of polyclonal antibody

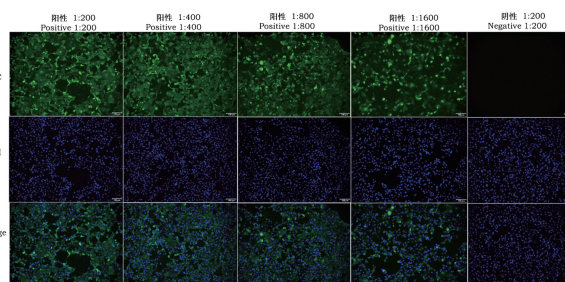


图7 HA 抗血清 IFA 鉴定(200×)

Fig. 7 IFA identification of HA antiserum(200×)

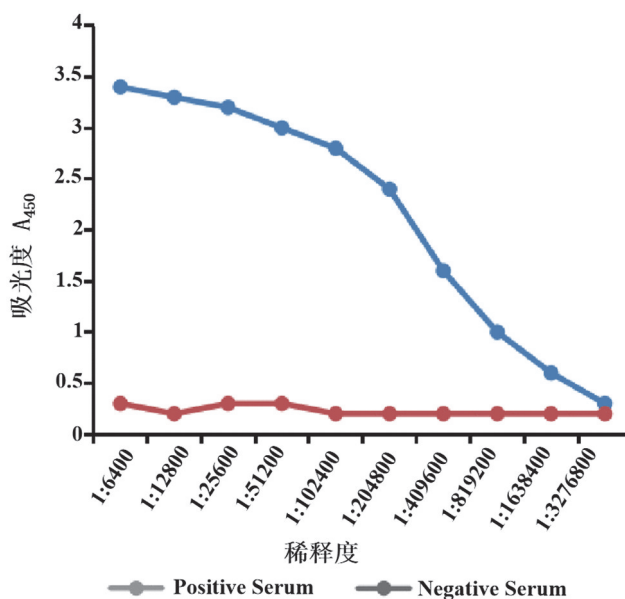


图8 ELISA 检测 HA 抗血清效价

Fig. 8 HA antiserum titer detection by ELISA

讨论

H9N2 流感病毒为低致病性流感病毒,以轻度临床症状为其感染特征,但其具有人畜共患的潜力^[4]。畜禽通过接种疫苗及早期诊断,减低病毒传播,以避免 H9N2 亚型流感病毒从家禽传播至人类。疫苗的接种是 AIV 防控最为关键措施之一,但传统的疫苗培育技术依赖鸡胚生产,操作简单但周期长,然而发现许多关于流感病毒的疫苗制备及检测方法的建立与 HA 基

因有关^[14-15]。除此之外,建立快速有效的诊断技术亦是 AIV 防控的重要手段,目前常用于临床诊断 AIV 的技术主要包括分子生物学及血清学两方面。其中血清学检测可广泛检测 AIV 抗体,而酶联免疫吸附试验(ELISA)操作简易且成本低,是目前常用的血清学检测方法。Ming 等^[16]基于自制 H9N2 禽流感病毒(AIV)单克隆抗体开发出对 H1、H7 等亚型 AIV 具有特异性的双抗体夹心酶联免疫吸附试验(DAS-ELISA)。王微等^[17]通过 pET32a 载体表达 H6 蛋白,建立了间接 ELISA 方法并用于鸡血清的检测,为禽流感流行病学调查提供了可行的技术手段。

本研究基于 H9N2 亚型 AIV HA 基因构建了原核表达载体 pET-32a-HA,并通过设计 8 个 IPTG 浓度、8 个诱导时间及 3 个温度筛选 pET-32a-HA 最适表达条件。结果表明,不同的 IPTG 浓度及作用时间对 pET-32a-HA 在 Rosetta 中的表达无明显差异,与黄瑜等^[18]高浓度 IPTG 或长时间诱导对大肠埃希菌生长具有一定抑制作用的结论相符。关于诱导表达过程中的温度,结果证实 28℃ 中 pET-32a-HA 表达效果较好,但温度过低同样会抑制细菌的生长及表达。

表达的重组 HA 蛋白通过 KCl 法纯化后免疫新西兰大白兔,制备 HA 兔抗血清。经 Western blot 和 IFA 验证,该抗血清可与相应抗原发生特异性反应。HI 检测抗血清的抗体效价为 1:128,间接 ELISA 效价为 1:1638400,表明原核表达的 HA 蛋白具有良好的免疫原性,为 H9N2 亚型 AIV 的鉴定及相关疫苗的研制奠定了基础。

【参考文献】

- [1] Castro-Sanguinetti GR, Marques SP, Apaza-Chiara AP, et al. Genetic subtyping and phylogenetic analysis of HA and NA from avian influenza virus in wild birds from Peru reveals unique features among circulating strains in America[J]. PLoS One, 2022, 17(6):e268957.
- [2] Krammer F, Smith G, Fouchier R, et al. Influenza[J]. Nat Rev Dis Primers, 2018, 4(1):3.
- [3] Dong J, Zhou Y, Pu J, et al. Status and challenges for vaccination against avian H9N2 influenza virus in China[J]. Life (Basel), 2022, 12(9):1326.
- [4] Fusade Boyer M, Djegui F, Batawui K, et al. Antigenic and molecular characterization of low pathogenic avian influenza A(H9N2) viruses in sub-Saharan Africa from 2017 through 2019[J]. Emerg Microbes Infect, 2021, 10(1):753-761.
- [5] 栾璐,倪小舒,刁小龙,等. 3 株 H9N2 亚型重组禽流感病毒生物学特性及免疫原性研究[J]. 中国家禽, 2022, 44(3):38-43.
- [6] Ripa RN, Sealy JE, Raghwan J, et al. Molecular epidemiology and pathogenicity of H5N1 and H9N2 avian influenza viruses in clinically affected chickens on farms in Bangladesh[J]. Emerg Microbes Infect, 2021, 10(1):2223-2234.
- [7] Peacock T, James J, Sealy JE, et al. A Global Perspective on H9N2 Avian Influenza Virus[J]. Viruses, 2019, 11(7):620.
- [8] Cui L, Liu D, Shi W, et al. Dynamic reassortments and genetic heterogeneity of the human-infecting influenza A (H7N9) virus[J]. Nat Commun, 2014, 5:3142.
- [9] Shen YY, Ke CW, Li Q, et al. Novel reassortant avian influenza A (H5N6) viruses in humans, Guangdong, China, 2015[J]. Emerg Infect Dis, 2016, 22(8):1507-1509.
- [10] Gu M, Xu L, Wang X, et al. Current situation of H9N2 subtype avian influenza in China[J]. Vet Res, 2017, 48(1):49.
- [11] De Graaf M, Fouchier RA. Role of receptor binding specificity in influenza A virus transmission and pathogenesis[J]. EMBO J, 2014, 33(8):823-841.
- [12] Cox NJ, Subbarao K. Global epidemiology of influenza: past and present[J]. Annu Rev Med, 2000, 51:407-421.
- [13] Wen F, Li W, Guo J, et al. Genetic characterization of a novel genotype H9N2 avian influenza virus from chicken in South China[J]. J Infect, 2020, 81(5):816-846.
- [14] 侯力嘉,吴胜昔,梁望旺,等. H9N2 禽流感病毒 HA 蛋白的原核表达与鉴定[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2020(10):58-61.
- [15] Sayedahmed EE, Elhashif A, Alhashimi M, et al. Adenoviral vector-based vaccine platforms for developing the next generation of influenza vaccines[J]. Vaccines (Basel), 2020, 8(4):574.
- [16] Ming F, Cheng Y, Ren C, et al. Development of a DAS-ELISA for detection of H9N2 avian influenza virus[J]. J Virol Methods, 2019, 263:38-43.
- [17] 王微,张霞,张人俊,等. 基于 H6 蛋白禽流感抗体间接 ELISA 检测方法建立与应用[J]. 山地农业生物学报, 2022, 41(1):21-27.
- [18] 黄瑜,张雪利,鲁义善,等. 红笛鲷 tdt 基因融合蛋白原核表达条件的优化及纯化[J]. 广东海洋大学学报, 2013, 33(1):44-49.

【收稿日期】 2023-02-25 【修回日期】 2023-05-13