

DOI:10.13350/j.cjpb.250704

• 论著 •

CRISPR/Cas9 敲降 FHL2 基因及 A549 细胞系构建研究

张辰超^{1,2}, 杨松惠², 许智强¹, 庄忻雨², 狄亚心^{2,3}, 于潼^{2,4}, 张桐^{2,5}, 王子良^{2,4}, 田明尧², 蔡锦顺^{1*}, 朱光泽^{6*}(1. 延边大学农学院, 吉林延边 133002; 2. 中国农业科学院长春兽医研究所; 3. 东北农业大学动物医学学院;
4. 吉林农业大学动物医学学院; 5. 吉林大学动物医学学院; 6. 长春中医药大学附属医院检验科)

【摘要】 目的 了解流感 B 型病毒(Influenza B virus)和水泡型口炎病毒(Vesicular Stomatitis Virus)的感染试验 FHL2 在细胞抗病毒活性作用。 **方法** 根据 GenBank 数据库中 FHL2 基因序列靶向设计 sgRNA, 合成并连接至慢病毒载体构建重组质粒。进行慢病毒包装并感染 A549 细胞。利用 Western blot 和 qPCR 对单克隆阳性细胞进行验证。再通过 Western blot 和 qPCR 验证 FHL2 敲降对 B 型流感病毒复制的影响。 **结果** 成功构建了重组质粒 LentiCRISPRv2, 敲降细胞系中 FHL2 的 mRNA 转录水平和蛋白表达水平明显下降, 且细胞活性与增殖均未受明显影响。病毒感染试验结果显示 FHL2 敲降细胞的病变效应高于野生株细胞, 流感病毒的增殖能力显著增强, IRF3 的表达明显下降, 表明敲降 FHL2 降低了细胞的抗病毒能力。 **结论** CRISPR/Cas9 技术成功构建 FHL2 基因敲降的 A549 细胞系, 初步验证了 FHL2 基因抗 B 型流感病毒感染和增殖的作用。

【关键词】 CRISPR/Cas9 基因编辑技术; FHL2; 细胞系; B 型流感病毒

【文献标识码】 A

【文章编号】 1673-5234(2025)07-0846-05

[*Journal of Pathogen Biology*. 2025 Jul.; 20(07):846–850.]

A preliminary study on the construction of a cell line based on CRISPR/Cas9 technology to knock down FHL2 gene and A549

ZHANG Chenchao^{1,2}, YANG Songhui², XU Zhiqiang¹, ZHUANG Xinyu², DI Yaxin^{2,3}, YU Tong^{2,4}, ZHANG Tong^{2,5}, WANG Zhiliang^{2,4}, TIAN Mingyao², CAI Jinshun¹, ZHU Guangze⁶ (1. College of Agriculture, Yanbian University, Yanji, 133002, Jilin, China; 2. Changchun Veterinary Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences; 3. College of Animal Medicine, Northeast Agricultural University; 4. College of Animal Medicine, Jilin Agricultural University; 5. College of Animal Medicine, Jilin University; 6. Department of Clinical Laboratory, Affiliated Hospital of Changchun University of Chinese Medicine)

【Abstract】 Objective To investigate the role of FHL2 in cellular antiviral activity during infection with Influenza B virus and Vesicular stomatitis virus. **Methods** Single-guide sgRNA targeting the FHL2 gene were designed based on its sequence in the GenBank database. These sgRNAs were synthesized and cloned into a lentiviral vector to generate recombinant LentiCRISPRv2 plasmids. Lentiviral particles were packaged and used to infect A549 cells. Monoclonal positive cell lines were validated via Western blotting and quantitative PCR (qPCR). The effect of FHL2 knockdown on IBV replication was further evaluated using Western blotting and qPCR. **Results** The LentiCRISPRv2 recombinant plasmid was successfully constructed. In FHL2-knockdown cell lines, both mRNA and protein expression levels of FHL2 were significantly reduced, with no observable impact on cell viability or proliferation. Viral infection assays demonstrated that FHL2 knockdown cells exhibited more pronounced cytopathic effects compared to wild-type cells, accompanied by significantly enhanced IBV replication and markedly reduced IRF3 expression. These results indicate that FHL2 depletion compromises cellular antiviral responses. **Conclusion** A stable FHL2-knockdown A549 cell line was successfully established using CRISPR/Cas9 technology. This study provides initial evidence for the antiviral role of FHL2 in inhibiting IBV infection and replication.

【Keywords】 CRISPR/Cas9 gene editing technology; FHL2; cell lines; influenza B virus;

* FHL2 也称为 LIM 蛋白, 是蛋白质相互作用中的重要衔接蛋白和修饰蛋白^[1]。它作为许多转录因子的共激活因子发挥作用, 例如 β -catenin、激活蛋白 1、CRE 蛋白、细胞外信号调节激酶 2 等^[2]。由于其 LIM 结构域蛋白特性, FHL2 能够与各种蛋白质相互作用, 并在调节肌肉和心脏组织中的基因表达、细胞生长和

* **【通信作者】** 蔡锦顺, E-mail: jinshunca@163.com

朱光泽, E-mail: zhuguangze820@162.com

【作者简介】 张辰超(2000-), 男, 吉林长春人, 硕士研究生, 主要研究方向为分子生物学与免疫学研究。
E-mail: 485854886@qq.com

信号转导中起着至关重要的作用。FHL2 蛋白家族与人类肿瘤的发生和发生密切相关,其在肿瘤组织中下调并通过限制细胞增殖来有效抑制肿瘤发展,从而起到抑癌基因的作用,并通过在肿瘤组织中上调并与多种转录因子结合来作为癌蛋白,抑制细胞凋亡,刺激细胞增殖和迁移,促进肿瘤进展。

在细菌和古细菌中发现的成簇规则间隔短回文重复序列 (CRISPR/Cas9) 是适应性免疫系统的一部分^[3-5],以及随后在人类细胞和其他真核生物中对基因编辑的适应,彻底改变了分子生物学领域^[6-8]。与其他基因编辑技术相比,如锌指核酸酶(ZFN)和转录激活因子样效应核酸酶(TALENS)^[9],它们需要为每个新的基因组靶标设计和生成新的蛋白质 DNA 结合结构域,而 CRISPR/Cas9 系统需 CRISPR 相关蛋白 9 (Cas9)和 RNA (sgRNA)两个组分,使 CRISPR/Cas9 系统成为更方便、更具成本效益和灵活的基因编辑工具。质粒递送的有效替代方案是病毒,其在细胞内递送核酸的天然能力可用于将 sgRNA 和/或 Cas9 引入细胞^[10-13]。腺相关病毒(AAV)、腺病毒(AV)和慢病毒(LV)通常用作哺乳动物细胞系和体内基因编辑的 CRISPR/Cas9 递送工具。

FHL2 基因参与细胞的凋亡,分化及肿瘤的发展,其基因也可以调节细胞免疫来抑制病毒的繁殖,本研究旨在利用 CRISPR/Cas9 技术构建 FHL2 敲降 A549 细胞系,初步验证 FHL2 基因对抗流感病毒感染和增殖的作用,为进一步研究 FHL2 基因的作用与机制提供细胞模型。

材料与方法

1 材料

人非小细胞肺癌细胞(A549)、构建存在 EGFP 的 LentiCRISPRv2 质粒、质粒 psPAX2、pMD2. G 以及 B 型流感病毒毒株均由本实验室保存。所有关于 B 型流感病毒的试验均在 P2 实验室进行。DMEM 培养基、Opti-MEM 培养基、胎牛血清购自 Gibco 公司; 12.5%PAGE 凝胶快速制备试剂盒购自上海雅酶生物医药科技有限公司;IP 裂解液塞维尔生物科技有限公司; CCK-8 细胞活性测试试剂盒购自碧云天公司; qPCRMasterMix 购自美国 Promega 公司;重组 Anti-FHL2 抗体购自英国 abcam 公司;betaActin 抗体、alphaTubulin 抗体购自美国 GeneTex 公司。

2 方法

2.1 重组质粒设计 靶向 sgRNA 设计通过 NCBI 网站搜索人 FHL2 基因组序列,使 CRISPR/Cas9 在线设计网站设计 sgRNA,使其与 BbsI 酶切后形成的粘性末端互补。设计引物序列如表 1 所示,设计的引物

交由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

表 1 引物序列
Table 1 Primer sequences

引物名称	序列(5'-3')
sgRNA-FHL2-1	CACCGGGAAGGGACCCAGAGGTGT
sgRNA-FHL2-2	CACCGGCTCGAGCTGAGCATTCGTA
LentiCRISPRv2GFP-FHL2Q	CACCGGGAAGGGACCCAGAGGTGTNGG
LentiCRISPRv2GFP-FHL2H	CACCGGCTCGAGCTGAGCATTCGTANGG

2.2 重组质粒的构建 将合成后的单链 DNA 稀释后各取 10 μL,进行程序性退火。Oligo 双链 DNA 与酶切后 LentiCRISPRv2GF P 载体连接并转化至感受态细胞,经过含氨苄青霉素的 LB 平板筛选后,挑取单克隆菌落扩大培养后提取质粒送至生工生物工程股份有限公司测序,获得重组质粒

2.3 慢病毒包装及感染 将 LentiCRISPRv2GFP-sgRNA 重组质粒辅助质粒 psPAX2 和 pMD2. G 按比例与转染试剂混匀转入 293T 细胞中,培养 12 h 后继续培养 48~72 h 后,荧光显微镜下观察,收集细胞,反复冻融 3 次,并保存,将病毒液按体积比 1 : 1 混合后加入 A549 细胞中,继续培养 48 h 后,荧光显微镜观察慢病毒感染效率。

2.4 单克隆细胞筛选 稀释细胞于 96 孔板中,每孔加入培养细胞悬液 150 μL 有且只有一个细胞,继续培养 7~14 d,观察细胞状态并在荧光显微镜下标记,14 d 后挑取单个细胞团的细胞转移到 12 孔板继续培养。通过 Western blot 及实时荧光定量 PCR 检验,筛选出敲降效率高的候选细胞株,连续亚克隆 3 代。

2.5 单克隆阳性细胞系实时荧光定量 PCR 鉴定 使用 RNA 提取试剂盒提取细胞总 RNA,测量浓度后再根据逆转录反应体系逆转录成 cDNA,反转录体系为: 28 μL RNA 和 2 μL Primer9,1 μL M-MLV Mixture Transcriptase,6 μL Recombinant RNase Inhibito,10 μL 5×MLV buffer,6 μL dNTP Mixture,加水补足至 50 μL。反转录条件为:RNA 与 Primer9 先混合 75 ℃ 5 min,冰浴 8 min。加入其余下反应体系 42 ℃ 90 min,75 ℃ 15 min。获得 cDNA 后进行 qPCR 反应 qPCR 体系为 2 μL cDNA,上下游引物各 0.2 μL,5 μL qPCRMix,加水补足至 10 μL。qPCR96 孔板中,设置为 3 个重复样本,放入荧光定量 PCR 检测仪器中。反应结束后,根据所得 Ct 值,按照 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 计算每个基因的相对表达量。

2.6 单克隆阳性细胞系 Western blot 鉴定 将候选细胞株铺板并培养后裂解细胞后,BCA 蛋白定量并使用 12% 胶板进行 SDS 电泳,转膜,封闭,使用重组 Anti-FHL2 抗体 4 ℃ 过夜孵育,使用一抗相对应的 HRP 二抗进行孵育,洗膜 3 次并显影分析其蛋白表

达,并命名为 kd-A549。

2.7 细胞增殖活性检测 将 kd-A549 与 A549 细胞分别接种在 3 个 96 孔板中,培养 12 h、24 h、48 h,使用 CCK-8 试剂盒进行细胞活性检测,每孔加入 10 μ L CCK-8 溶液后放入培养箱中避光孵育 1 h。用酶标仪测定在 450 nm 处的吸光度。

2.8 下游蛋白 IRF3 Western blot 检测 参照方法 2.6 进行 Western blot 检测 IRF3 蛋白。

2.9 病毒增殖检测 将 kd-A549 细胞与 A549 细胞分别接种于 24 孔板中,将 B 型流感病毒和 VSV 病毒以 1MOL/孔接种至 kd-A549 细胞与 A549 细胞中,在 24 h 和 36 h 后观察细胞状态。另将 B 型流感病毒接种至 kd-A549 细胞与 A549 细胞中,在 24 h、48 h 收取细胞,通过 qPCR 和 Western blot 检测 FHL2 敲降对病毒增殖的影响。

3 统计学分析

采用 GraphPadPrism8 软件进行数据统计、分析及图表绘制,组间数据差异性分析采用 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1 FHL2 基因组敲降鉴定

本研究构建的重组质粒 LentiCRISPRv2GFP-sgRNA-Q 和 LentiCRISPRv2GFP-sgRNA-H, 见图 1A 图 1B。酶切载体质粒见图 2。将退火后的双联 sgRNA 连接至 LentiCRISPRv2 慢病毒载体构建重组质粒,测序结果正确。

2 慢病毒包装和感染

重组质粒 LentiCRISPRv2GFP-sgRNA 和辅助质粒转染 293T 细胞包装慢病毒见图 3 所示,在细胞转染 48 h 后,慢病毒重组质粒中 EGFP 荧光基因成功表达,两种慢病毒混匀后感染 A549 细胞观察荧光见图 4,感染 48 h 后观察到 EGFP 荧光信号,慢病毒成功感染细胞。

3 单克隆细胞的筛选与敲降效果验证

候选的 8 株单克隆 A549 细胞 Western blot 结果见图 5A, kd-b1 和 kd-b3 细胞敲降效果理想。kd-b3 进行后续亚克隆和传代培养,亚克隆 3 代后的单克隆细胞株中 FHL2 蛋白的表达水平见图 5B,单克隆阳性 kd-A549 细胞株中 FHL2 蛋白表达量明显降低。FHL2 基因敲降的 A549 细胞系 CCK8 细胞增殖结果见图 5C,单克隆细胞株 kd-A549 在不同时间段与野生型细胞相比其活性差异不显著。

4 FHL2 敲降细胞系感染病毒后的病变观察

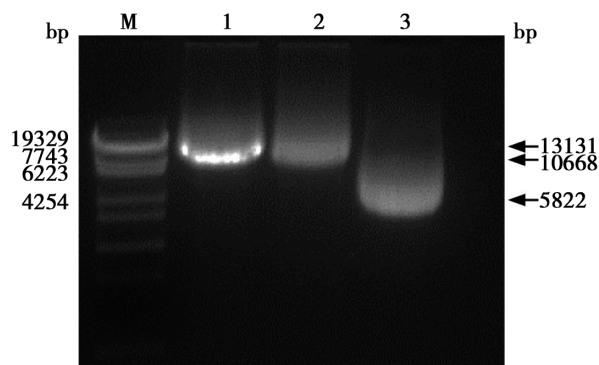
相较于野生型细胞,FHL2 敲降细胞接种不同病毒后细胞皱缩变成球形见图 6,抗 B 型流感病毒和

VSV 病毒感染能力下降。FHL2 敲降细胞系对 B 型流感病毒增殖研究实时荧光定量 PCR 结果见图 7,在 kd-A549 细胞中,病毒 RNA 水平 48 h ($t=4.520, P=0.0039$) 显著高于对照组细胞中的病毒 RNA 水平。



A 重组质粒 LentiCRISPRv2GFP-sgRNA-Q B 重组质粒 LentiCRISPRv2GFP-sgRNA-H

图 1 重组质粒
Fig. 1 Recombinant plasmid



M DNA 分子量标准 1 线性化 LentiCRISPRv2GFP 2 psPAX2 3 pMD2.G

图 2 质粒构建
Fig. 2 Plasmid Construction

5 Western blot 鉴定 B 型流感病毒 N 蛋白表达及下游蛋白 IRF3 表达的检测

Western blot 结果见图 8A,在 kd-A549 细胞中, N 蛋白表达水平明显高于对照组细胞中的病毒蛋白表达水平,FHL2 的降低提高了病毒的增值能力。IRF3 表达水平显著下降见图 8B,FHL2 缺失影响 IRF3 的表达。

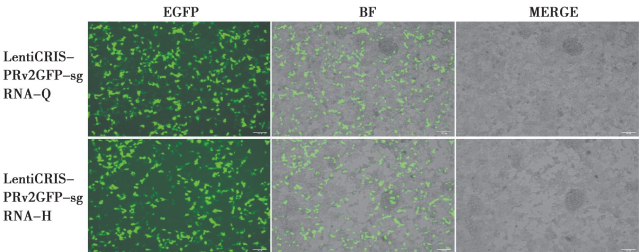


图 3 慢病毒包装 48 h 后 EGFP 绿色荧光蛋白表达荧光图
Fig. 3 Fluorescence map of EGFP green fluorescent protein expression after 48 h of lentivirus packaging

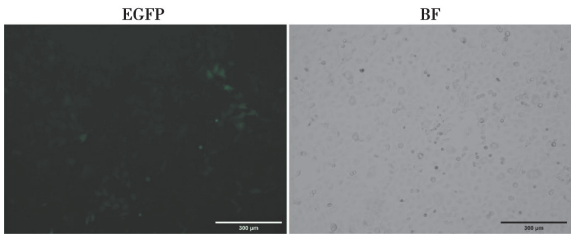
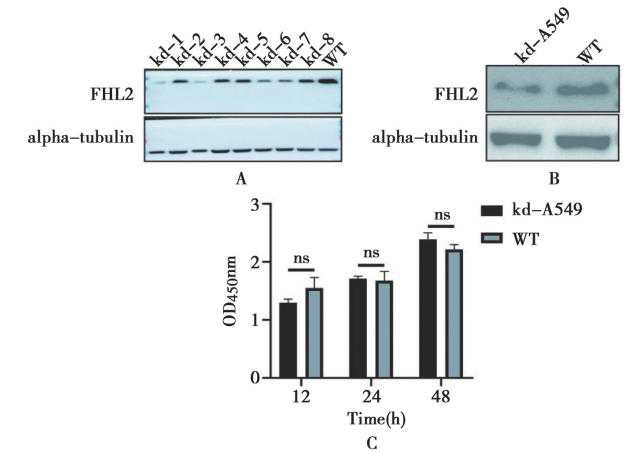


图 4 慢病毒感染 A549 细胞荧光图
Fig. 4 Fluorescence map of lentivirus-infected A549 cells



A 不同单克隆细胞株 FHL2 蛋白表达水平 B 单克隆阳性细胞 FHL2 表达 C CCK-8 细胞活性检测($P>0.05$)
Fig. 5 Screening and validation of monoclonal cells

讨论

CRISPR/Cas9 系统是一种有效的基因编辑方法,也是哺乳细胞模型常见的工具^[14],FHL2 主要存在于细胞核中或均匀分布在不同的细胞区室中,其表达模式取决于它们表达的细胞类型、分化阶段或对刺激的反应^[15]。FHL2 在控制信号通路中发挥重要作用。研究表明,FHL2 基因通过多种机制影响病毒复制,如调控病毒基因表达、参与病毒组装和释放、调节宿主免

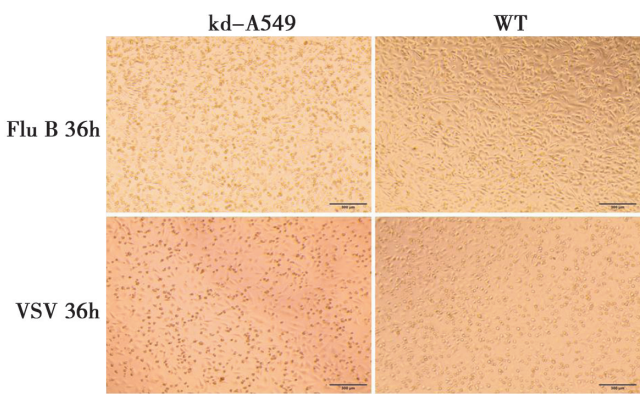


图 6 不同病毒接种细胞显微镜图(200×)
Fig. 6 Microscopic view of different virus-inoculated cells

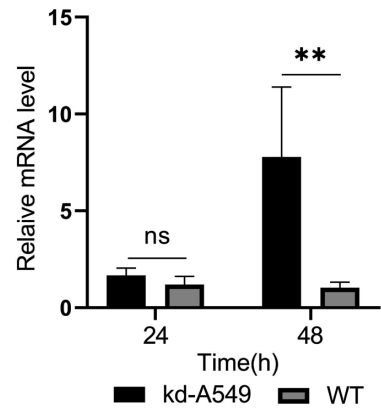
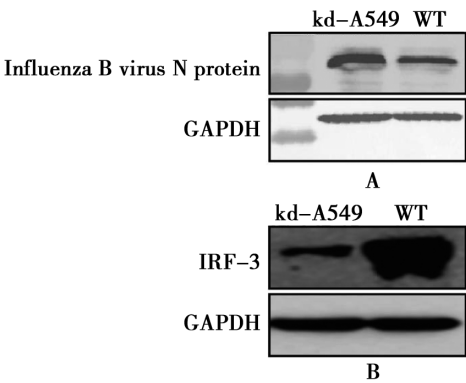


图 7 qPCR 鉴定 B 型流感病毒 N 蛋白 mRNA 水平
Fig. 7 qPCR analysis of influenza B virus N protein mRNA levels



A B 型流感病毒 N 蛋白表达病毒增殖图 B 单克隆阳性细胞株
图 8 Western blot 鉴定蛋白表达
Fig. 8 Western blot analysis of protein expression

疫反应等。在流感 A 病毒的研究中,A549 细胞对于敲降 Cullin-2 基因对病毒复制产生影响^[16]且其他报道显示 FHL2 基因为病毒传播的新型调节器,限制病毒复制并支持肺部炎症^[17],FHL2 通过增强干扰素- β (IFN- β)的表达来抑制 SARS-CoV-2 的复制^[18]。为了证明 FHL2 基因是否有抗 B 型流感病毒病毒感染的作用,通过 CRISPR/Cas9 技术敲降了 FHL2 基因,选择评分相似度较高的 sgRNA 敲降位点实现

对 A549 细胞系的编辑。流感 B 型病毒与 VSV 病毒感染后镜下观察,发现敲降 FHL2 的细胞系病变明显而未敲降的细胞系没有明显变化,在 B 型流感病毒的增殖实验中 FHL2 基因敲降的细胞系病毒增殖明显高于野生型细胞。表明 FHL2 基因缺失降低了细胞抗 B 型流感病毒感染和增殖能力。IRF-3 的 Western blot 结果也表明 FHL2 是通过调控 IRF3 蛋白的表达发挥其抑制病毒复制的功能的调控。

本研究利用 CRISPR/Cas9 技术构建了 FHL2 基因敲降的 A549 细胞,筛选并获得 FHL2 基因敲降后的 A549 细胞单克隆细胞株。发现了 FHL2 基因敲降后使流感病毒的复制能力增强,为后面继续研究 FHL2 基因对细胞免疫的机制提供细胞模型。

【参考文献】

- [1] Bachi B. The LIM domain: regulation by association[J]. Mech Dev, 2000, 91(1-2): 5-17.
- [2] Martin B, Schneider R, Janetky S, et al. The LIM-only protein FHL2 interacts with beta-catenin and promotes differentiation of mouse myoblasts[J]. J Cell Biol, 2002, 159(1): 113-122.
- [3] Van Soolingen D, De Haas P, Hermans PW, et al. Comparison of various repetitive DNA elements as genetic markers for strain differentiation and epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis* [J]. J Clin Microb, 1993, 31(8): 1987-1995.
- [4] Makarov, VK, Grishin, NV, Shabalin, AS, et al. A putative RNA-interference-based immune system in prokaryotes; computational analysis of the predicted enzymatic machinery, functional analogies with eukaryotic RNAi, and hypothetical mechanisms of action[J]. Biol Direct, 2006, 1(13): 7.
- [5] Barrangou R, Fremaux C, Deveau H, et al. CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes[J]. Science, 2007, 315(5819): 1709-1712.

- [6] Cong L, Ran F, Cox D, et al. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems[J]. Science, 2013, 339(6121): 819-823.
- [7] Jinek M, East A, Cheng A, et al. RNA-programmed genome editing in human cells[J]. eLife, 2013, 2: e00471.
- [8] Mali P, Yan L, Esvelt KM, et al. RNA-guided human genome engineering via Cas9[J]. Science, 2013, 339(6121): 823-826.
- [9] Gaj T, Gersbach CA, Barbas CF, et al. ZFN, TALEN, and CRISPR/Cas-based methods for genome engineering[J]. Tren Biotechnol, 2013, 31(7): 397-405.
- [10] Gross A, Schoendube J, Zimmermann S, et al. Technologies for Single-Cell Isolation[J]. Int J Mol Sci, 2015, 16(8): 16897-16919.
- [11] Dattas M, Malhotra L, Dickerson R, et al. Laser capture microdissection: Big data from small samples [J]. Histol Histopath, 2015, 30(11): 1255-1269.
- [12] Miltenyi S, Muller W, Weichel W, et al. High gradient magnetic cell separation with MACS[J]. Cytometry, 1990, 11(2): 231-238.
- [13] McFarland DC. Preparation of pure cell cultures by cloning[J]. Method Cell Sci, 2000, 22(1): 63-66.
- [14] Chmielewska AM, Gmez-Herranz M, Gach P, et al. The role of IFITM proteins in tick-borne encephalitis virus infection[J]. J Virol, 2022, 96(1): e0113021.
- [15] Vangheluwe, M. The multifunctional roles of the four-and-a-half-LIM only protein FHL2[J]. Cell Mol Life Sci, 2006, 63(3): 268-284.
- [16] 史馨瑾, 王俊, 刘英楠, 等. Cullin-2 基因敲除 A549 细胞系构建及其对 A 型流感病毒复制的影响[J]. 中国动物传染病学报, 2022, 30(5): 29-35.
- [17] Masemann D, Dantas RL, Sitnick S, et al. The four-and-a-half LIM domain protein 2 supports influenza A virus-induced lung inflammation by restricting the host adaptive immune response [J]. Am J Pathol, 2018, 188(5): 1236-1245.
- [18] Xu, Z, Tian, M, Tan, Q, et al. Fhl2 inhibits SARS-CoV-2 replication by enhancing IFN- β expression through regulating IRF-3[J]. Int J Mol Sci, 2024, 25: 353-353.

【收稿日期】 2024-12-21 【修回日期】 2025-03-10

(上接 845 页)

- [15] Zhu M, Wang Y, Han J, et al. Artesunate exerts organ- and tissue-protective effects by regulating oxidative stress, inflammation, autophagy, apoptosis, and fibrosis: a review of evidence and mechanisms[J]. Antioxidants (Basel), 2024, 13(6): 686-701.
- [16] Zhang J, Li Y, Wan J, et al. Artesunate: A review of its therapeutic insights in respiratory diseases[J]. Phytomedicine, 2022, 104(36): 1259-1271.
- [17] Jiang W, Luo W, Zhang Z, et al. Hla protein expression and artesunate prevented mice from further damage caused by *Staphylococcus aureus* pneumonia [J]. Int J Biol Macromol, 2024, 277(1): 1340-1356.
- [18] Hu Y, Liu M, Qin H, et al. Artemether, artesunate, arteannuin b, echinatin, licochalcone b and andrographolide effectively inhibit SARS-CoV-2 and related viruses in vitro[J]. Front Cell Infect Microbiol, 2021, 11(14): 6827-6839.
- [19] 周永君, 张静, 巫波, 等. 青蒿琥酯对甲型流感病毒肺炎的治疗作用研究[J]. 四川大学学报(医学版), 2022, 53(6): 1055-1060.
- [20] Lian L, Le Z, Wang Z, et al. SIRT1 inhibits high glucose-induced

TXNIP/NLRP3 inflammasome activation and cataract formation [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2023, 64(3): 16-29.

- [21] Wang L, Zhao H, Xu H, et al. Targeting the TXNIP-NLRP3 interaction with PSSM1443 to suppress inflammation in sepsis-induced myocardial dysfunction[J]. J Cell Physiol, 2021, 236(6): 4625-4639.
- [22] Zhang Y, Aisker G, Dong H, et al. Urolithin A suppresses glucolipotoxicity-induced ER stress and TXNIP/NLRP3/IL-1 β inflammation signal in pancreatic β cells by regulating AMPK and autophagy[J]. Phytomedicine, 2021, 93(45): 1537-1549.
- [23] Si Y, Liu L, Zhang Y, et al. Magnesium hydride protects against acetaminophen-induced acute kidney injury by inhibiting TXNIP/NLRP3/nf- κ b pathway[J]. Ren Fail, 2024, 46(1): 2336-2351.
- [24] Xu Z, Li J, Zhou K, et al. Exocarpium Citri Grandis ameliorates LPS-induced acute lung injury by suppressing inflammation, NLRP3 inflammasome, and ferroptosis[J]. J Ethnopharmacol, 2024, 329(17): 1181-1194.

【收稿日期】 2025-02-27 【修回日期】 2025-05-06