

文章编号 1006-8147(2023)02-0148-05

论 著

IL-17A 对卵巢癌进展的影响及机制研究

郑小燕,郁春艳,刘俊汝,刘子璇,陈思琦,邓为民

(天津医科大学基础医学院免疫学系,国家教育部免疫微环境与疾病重点实验室,天津 300070)

摘要 目的:采用动物实验和临床标本探讨白细胞介素-17A(IL-17A)对卵巢癌(OvCa)进展的影响,并探索相应机制。方法:以 C57BL/6 遗传背景的野生型(WT)小鼠和 IL-17A 缺陷型(IL-17A^{-/-})小鼠为研究对象,原位注射相同基因背景来源的小鼠 OvCa 细胞系 ID8 构建卵巢原位种植瘤模型,观察 IL-17A 对小鼠 OvCa 生长转移的影响。应用 Western 印迹检测 WT 小鼠和 IL-17A^{-/-}小鼠肿瘤组织中信号转导和转录激活因子 3(STAT3)、磷酸化 STAT3(p-STAT3)、脂肪酸结合蛋白 4(FABP4)表达情况,以探讨 IL-17A 促进 OvCa 进展的机制。收集 OvCa 患者临床病理组织切片标本,应用免疫组化分析 IL-17A、FABP4 表达与 OvCa 进展的相关性。**结果:**WT 小鼠造模部位卵巢明显肿大,与周围组织黏连,其表面可见若干瘤结节;IL-17A^{-/-}小鼠卵巢肿大,与周围组织无黏连,表面瘤结节较少。与 WT 小鼠相比,IL-17A^{-/-}小鼠腹腔瘤结节显著减少($t=5.132, P<0.05$)。Western 印迹结果显示与 WT 小鼠相比,IL-17A^{-/-}小鼠肿瘤组织中 p-STAT3、FABP4 蛋白表达显著降低(均 $P<0.05$)。OvCa 患者临床病理标本显示 IL-17A、FABP4 表达与癌症 FIGO 分期、转移相关(均 $P<0.05$),并且在 OvCa 患者中 IL-17A 与 FABP4 表达也具有一定相关性($P<0.05$)。**结论:**动物实验和临床标本证实 IL-17A 通过上调 FABP4 表达促进 OvCa 进展。

关键词 IL-17A;卵巢癌;FABP4

中图分类号 R737.31

文献标志码 A

Effect and mechanism of IL-17A on the progression of ovarian cancer

ZHENG Xiao-yan, YU Chun-yan, LIU Jun-ru, LIU Zi-xuan, CHEN Si-qi, DENG Wei-min

(Department of Immunology, School of Basic Medical Sciences, Tianjin Medical University, Key Laboratory of Diseases and Microenvironment of Ministry of Education of China, Tianjin 300070, China)

Abstract Objective: Animal experiments and clinical specimens were applied to investigate the effect of interleukin-17A (IL-17A) on the progression of ovarian cancer (OvCa), and to explore the corresponding mechanism. **Methods:** Wild-type (WT) mice and IL-17A-deficient (IL-17A^{-/-}) mice with C57BL/6 genetic background were used as the research objects, and the mouse OvCa cell line ID8 derived from the same genetic background was injected in situ to construct ovarian orthotopic tumor implantation model to observe the effect of IL-17A on the growth and metastasis of OvCa in mice. Western blotting was used to detect the expression of signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3), phosphorylated STAT3 (p-STAT3) and fatty acid-binding protein 4 (FABP4) in tumor tissues of WT mice and IL-17A^{-/-} mice to explore the mechanism of IL-17A promoting OvCa progression. The clinicopathological specimens of OvCa patients were collected and immunohistochemistry was used to analyze the correlation between the expression of IL-17A, FABP4 and OvCa progression. **Results:** The ovaries of WT mice were obviously enlarged and adhered to the surrounding tissues, and several nodules were seen on the surface of the ovaries. The ovaries of IL-17A^{-/-} mice were enlarged, without adhesion to the surrounding tissues, and there were few tumor nodules on the surface. Compared with WT mice, the tumor nodules in the peritoneal cavity of IL-17A^{-/-} mice were significantly reduced ($t=5.132, P<0.05$). Western blotting showed that compared with WT mice, the protein expressions of p-STAT3 and FABP4 of tumor nodules in IL-17A^{-/-} mice were significantly decreased (both $P<0.05$). The clinicopathological specimens of OvCa showed that the expression of IL-17A and FABP4 was correlated with FIGO stage and metastasis of cancer (both $P<0.05$), and the expression of IL-17A was also correlated with FABP4 in OvCa patients ($P<0.05$). **Conclusion:** Results of animal experiments and clinical specimens confirmed that IL-17A promoted OvCa progression by upregulating the expression of FABP4.

Key words ovarian cancer; IL-17A; FABP4; progression of cancer

卵巢癌(ovarian cancer, OvCa)是一种腹腔内肿瘤,具有向网膜转移的明显倾向性,临床数据显示

有 80% 的 OvCa 患者存在网膜转移^[1]。脂肪细胞是 OvCa 转移至网膜的主要介质,其分泌脂肪因子,如白细胞介素(IL)-6、IL-8、单核细胞趋化因子(MCP)1,促进肿瘤优先归巢至网膜;随后,脂肪细胞为肿瘤提供脂肪酸(FA)促进肿瘤快速增殖生长^[1-3]。几类脂肪酸受体参与肿瘤细胞对 FA 的摄取转运,在 FA 易

基金项目 国家自然科学基金(82273340);京津冀基础研究合作专项(20JCZXC00140)

作者简介 郑小燕(1999-),女,硕士在读,研究方向:肿瘤免疫;通信作者:邓为民, E-mail: dengweimin@tmu.edu.cn。

位至细胞膜内侧时,脂肪酸结合蛋白(fatty acid-binding protein, FABPs)与FA结合并将其运送至细胞器进行代谢^[4]。FABP4是FABPs家族最丰富成员之一,多项研究显示FABP4参与OvCa网膜转移,CRISPR介导的FABP4敲除或使用小分子抑制剂(BMS309403)可显著减轻小鼠肿瘤负担,并增强对铂类治疗的敏感性^[3,5-6]。目前靶向FABP4已成为延缓OvCa进展的一个策略,但是影响FABP4表达的因素还需进一步明确。

炎症微环境是肿瘤微环境的一个重要组成部分。Mukherjee等^[4]报道IL诱导脂肪细胞中脂质分解,释放FA。IL-17A属于多效性炎症因子,是IL-17家族研究最多且最具代表性的细胞因子,其主要通过IL-17A受体(IL-17RA)发挥作用^[7]。多项研究显示IL-17A在肿瘤中表达上调,通过促进血管生成^[8];提高调节性T细胞(Treg)免疫抑制活性加速肿瘤进展^[9-10]。Bilska等^[11]研究显示在OvCa患者血浆和腹膜液中IL-17A水平显著高于良性肿瘤组及对照组;此外,IL-17A在脂肪细胞中也扮演重要角色^[12],基于此本课题组在OvCa中探讨IL-17A是否影响FABP4表达进而促进OvCa进展。前期的细胞实验表明外源性IL-17A可通过其受体直接作用于卵巢癌细胞系A2780和OVCAR3,通过激活信号转导与转录激活因子(SATA)3信号促进FABP4表达。在体外研究的基础上,本文旨在通过动物实验和临床标本探讨IL-17A对OvCa进展的影响并验证其相关机制。

1 材料与方法

1.1 材料 小鼠卵巢上皮乳头状浆液性腺癌细胞系ID8由南开大学李鲁远教授惠赠;C57BL/6遗传背景的野生型(WT)小鼠购自中国军事医学科学院实验动物中心,雌性,6~8周龄,体重18~20 g;C57BL/6遗传背景的IL-17A缺陷型(IL-17A^{-/-})小鼠由日本东京理科大学生物医学科学研究所Yoichiro Iwakura教授惠赠,雌性,6~8周龄,体重18~20 g;DMEM培养基购自南京凯基生物科技发展有限公司;胎牛血清(FBS)购自GIBCO公司;IL-17A(DF6127)、FABP4(DF6035)、STAT3(AF6294)、磷酸化STAT3(p-STAT3)(Tyr705, AF3293)、GAPDH(AF7021)抗体购自Affinity公司,以上抗体人鼠通用,用做后续的Western印迹和免疫组化实验;30例OvCa患者的病理组织石蜡切片标本来自天津市中心妇产医院,同时收集患者的临床病理资料。这些标本及病理资料的使用均已获得天津市中心妇产医院伦理委员会批准。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 ID8细胞用含有10% FBS的DMEM培养基培养,每1~2天更换培养液并消化传代,培养箱条件为37℃,CO₂浓度为5%。待ID8细胞处于对数生长期,消化处理进行后续实验。

1.2.2 小鼠体内实验 腹腔注射氯胺酮麻醉小鼠,待角膜反射消失后将其固定,如Connolly等^[13]报道所述,将ID8细胞以1×10⁶/20 μL PBS/只的剂量原位注射于6~8周雌性C57BL/6遗传背景的WT小鼠和IL-17A^{-/-}小鼠卵巢囊内(每组6只),通过观察卵巢囊肿膨胀来确定注射是否成功。每日测量小鼠体重观察小鼠状态。8周后颈椎脱臼处死小鼠,打开腹腔观察小鼠卵巢囊内成瘤和腹腔转移情况,并使用佳能90D单反相机进行拍照。

1.2.3 Western印迹 用RIPA裂解液(含蛋白酶抑制剂)充分裂解小鼠肿瘤组织提取总蛋白,BCA测定蛋白含量。将蛋白等量上样于10%聚丙烯酰胺凝胶中电泳,PVDF转膜,3%的牛血清白蛋白(BSA)封闭非特异性抗原后,添加一抗GAPDH(1:1 000),STAT3(1:1 000),p-STAT3(1:1 000),FABP4(1:1 000),4℃低速震荡孵育过夜,次日,加入二抗室温孵育2 h,化学发光成像仪扫描条带,Image J软件分析蛋白条带。以GAPDH为内参,目的条带与内参条带比值表示目的蛋白相对表达量。

1.2.4 免疫组织化学染色 石蜡切片标本厚度为5 μm。切片经常规脱蜡、脱水后,将其置于柠檬酸钠缓冲液中微波炉煮沸进行抗原修复,恢复至室温后去除内源性过氧化物酶,血清封闭,滴加一抗IL-17A(1:200),FABP4(1:200)于4℃孵育过夜。次日,进行二抗孵育,DAB显色,复染,脱水透明封片。实验步骤按试剂盒说明书进行。

结果判定标准:采用Mattern积分法对染色结果进行评分,每个标本在显微镜(400×)下随机选择10个视野,结合阳性细胞百分比和染色强度综合判断。染色强度分4级:无阳性着色0分;浅棕褐色1分;棕褐色2分;深棕褐色3分。阳性细胞数占视野中总细胞数的百分比分4级:无阳性细胞记0分;1%~25%记1分;26%~50%记2分;50%以上记3分。染色强度评分加阳性细胞百分比评分为最终得分。得分<3分为阴性表达(-),≥3分为阳性表达(+)

1.3 统计学处理 采用GraphPad Prism 9进行统计学分析并绘图。两组间比较采用 t 检验,用四格表Fisher's精确检验分析IL-17A、FABP4表达与临床病理资料的关系。以 $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

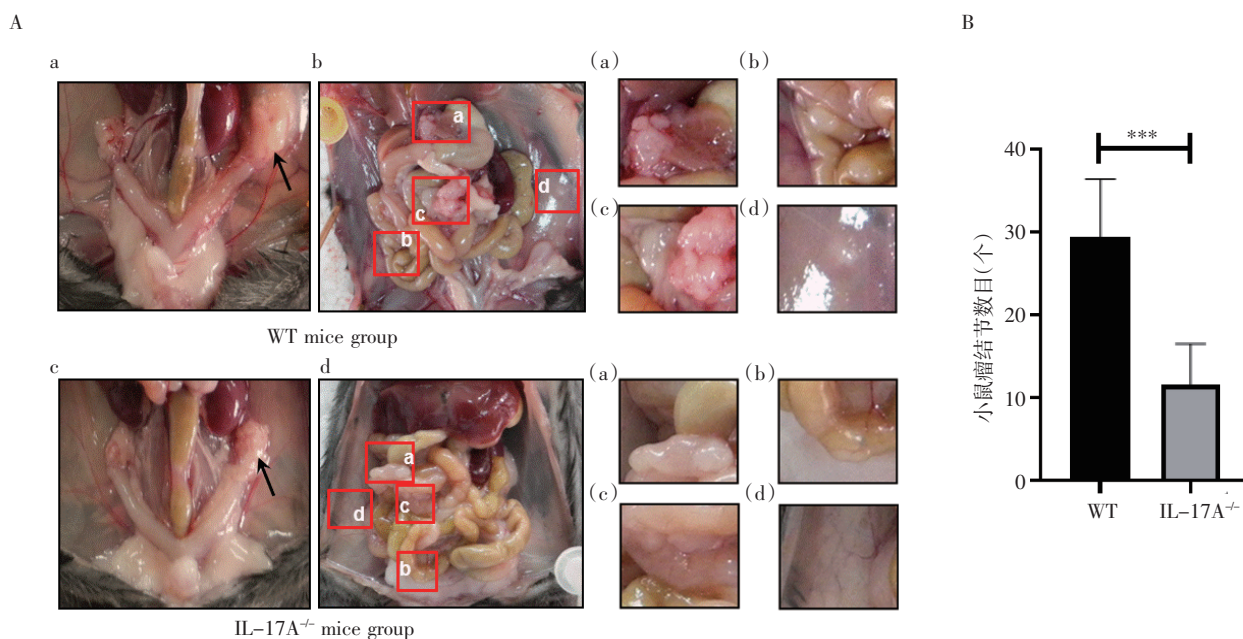
2 结果

2.1 IL-17A 促进小鼠 OvCa 原位成瘤和腹腔转移 由图 1 可知,WT 小鼠造模部位卵巢明显肿大,与周围组织黏连,其表面可见若干瘤结节,分界不清(图 1Aa);肿瘤广泛分布于腹腔,在网膜、肠系膜、肠管外壁和腹壁可见明显瘤结节[图 1Ab(a)~(d)所示]。IL-17A^{-/-}小鼠造模部位卵巢肿大,与周围组织无黏连,表面瘤结节较少(图 1Ac)。与 WT 小鼠相比,IL-17A^{-/-}小鼠腹腔瘤结节显著减少(图 1B, $t=5.132$, $P<0.05$)。

2.2 IL-17A 通过激活 STAT3 信号促进 FABP4 表达 由图 2 可知,与 WT 小鼠相比,IL-17A^{-/-}小鼠肿

瘤组织中 FABP4、p-STAT3 蛋白表达显著降低,差异具有统计学意义(图 2B, $t=11.347, 8.180$, 均 $P<0.01$);然而,两组之间 STAT3 表达无统计学差异(图 2B, $t=0.110$, $P>0.05$)。

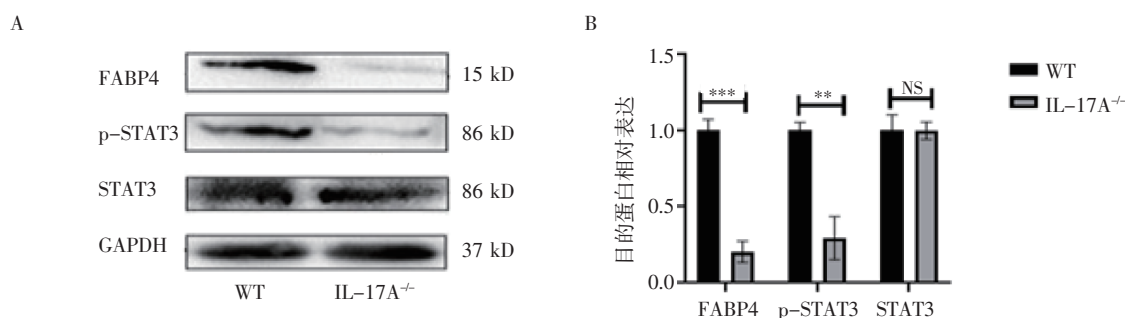
2.3 IL-17A 在 OvCa 患者中的表达 收集 30 例 OvCa 患者石蜡切片标本进行免疫组织化学染色。有 15 例患者(50%)IL-17A 呈阳性表达,13 例患者(43.3%)FABP4 呈阳性表达,染色结果如图 3 所示。在 IL-17A 阳性组中 FABP4 阳性表达率为 66.7%,在 IL-17A 阴性组中 FABP4 阳性表达率为 20%,IL-17A 表达与 FABP4 表达具有一定相关性,差异具有统计学意义(表 1)。



注:A:小鼠卵巢原位成瘤和腹腔转移情况;a,c:小鼠卵巢原位成瘤情况;b,d:小鼠腹腔肿瘤分布情况,(a)网膜、(b)肠系膜、(c)肠管外壁、(d)腹壁;B:小鼠瘤结节计数统计分析($n=6$);IL-17A:白细胞介素-17A;OvCa:卵巢癌;*** $P<0.001$

图1 IL-17A 促进小鼠 OvCa 原位成瘤和腹腔转移

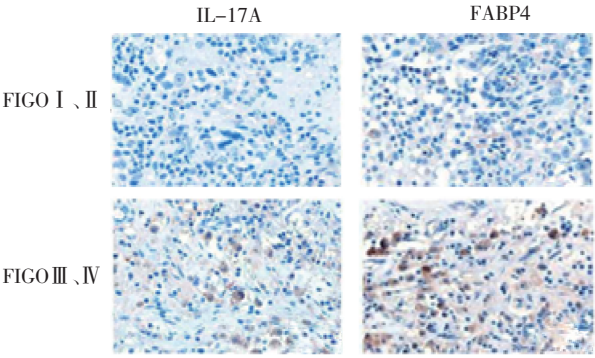
Fig 1 IL-17A promoted orthotopic tumorigenesis and intraperitoneal metastasis of OvCa in mice



注:A:FABP4、p-STAT3、STAT3 蛋白表达;B: 两组之间 FABP4、p-STAT3、STAT3 蛋白相对表达量比较;IL-17A: 白细胞介素-17A; FABP4:脂肪酸结合蛋白 4;p-STAT3:磷酸化信号转导及转录激活因子3;STAT3:信号转导及转录激活因子 3;GAPDH:内参蛋白;*** $P<0.001$; ** $P<0.01$;NS:无显著差异

图2 小鼠肿瘤组织中 FABP4、p-STAT3、STAT3 蛋白表达

Fig 2 Expression of FABP4, p-STAT3 and STAT3 proteins in mouse tumor tissue



注:IL-17A:白细胞介素-17A;FABP4:脂肪酸结合蛋白 4

图 3 人卵巢癌组织中 IL-17A、FABP4 表达情况(400×)

Fig 3 Expression of IL-17A and FABP4 in human ovarian cancer tissues(400×)

表 1 IL-17A 与 FABP4 的相关分析

Tab 1 Correlation analysis between IL-17A and FABP4

项目	IL-17A(+)	IL-17A(-)	P
FABP4(+)	10	3	0.025
FABP4(-)	5	12	

注:IL-17A:白细胞介素-17A;FABP4:脂肪酸结合蛋白 4

使用 Fisher's 精确检验分析 IL-17A、FABP4 表达与 OvCa 患者临床病理资料的关系。结果显示 IL-17A、FABP4 表达与患者年龄无关(均 $P>0.05$),与癌症 FIGO 分期、转移有明显关系(均 $P<0.05$),见表 2、3。

表 2 IL-17A 与临床病理资料之间的关系

Tab 2 Relationship between IL-17A expression and clinicopathological data

项目	IL-17A(+)	IL-17A(-)	P
年龄(岁)			0.710
≤50	5	7	
>50	10	8	
FIGO 分期			0.027
I / II	4	11	
III / IV	11	4	
转移			0.060
无	3	9	
有	12	6	

注:IL-17A:白细胞介素-17A

表 3 FABP4 与临床病理资料之间的关系

Tab 3 Relationship between FABP4 expression and clinicopathological data

项目	FABP4(+)	FABP4(-)	P
年龄(岁)			0.465
≤50	4	8	
>50	9	9	
FIGO 分期			0.025
I / II	3	12	
III / IV	10	5	
转移			0.028
无	2	10	
有	11	7	

注: FABP4:脂肪酸结合蛋白 4

3 讨论

OvCa 是最致命的妇科恶性肿瘤,其致死率高、预后较差^[14]。由于该疾病隐匿,大多数患者在晚期确诊,表现为腹腔转移和腹水形成^[15]。目前,手术加铂类/紫杉类为主的化疗是 OvCa 患者主要治疗方案,但由于化疗耐药的出现,患者 5 年生存率并没有显著提高^[16-17]。

FABP4 是重要的脂质伴侣蛋白,通过结合和重新分配脂肪酸来协调细胞内脂质反应^[3]。FABP4 主要在脂肪细胞和巨噬细胞表达,参与糖尿病胰岛素抵抗、炎症以及血管生成^[18-20]。在前列腺癌和 OvCa 中,FABP4 是脂肪细胞参与癌症进展的关键介质^[5]。研究显示 FABP4 在 OvCa 中高表达,通过摄取游离脂肪酸为癌细胞提供能量,促进癌细胞增殖和网膜转移^[3,5]。FABP4 已成为治疗优先转移至脂肪组织的腹腔播散性肿瘤(如 OvCa、胃癌和结肠癌)的极好靶点^[1]。本研究通过动物实验和临床标本证实 IL-17A 可通过激活 STAT3 信号通路上调 FABP4 表达,进而促进 OvCa 生长转移。

本课题组前期体外结果显示外源性 IL-17A 可通过其受体直接作用于卵巢癌细胞系 A2780 和 OVCAR3,通过激活 STAT3 信号促进 FABP4 表达。棕榈酸(PA)是一种常用的长链脂肪酸,充当外源脂肪酸来源,体外研究表明在 PA、IL-17A 存在的情况下,肿瘤细胞通过 IL-17A/IL-17RA/p-STAT3/FABP4 轴增强对 PA 的摄取,促进细胞增殖。

为了进一步探讨 IL-17A 对 OvCa 生长转移的影响,本研究以相同基因背景来源的 IL-17A^{-/-}小鼠和 WT 小鼠为研究对象建立原位种植瘤模型,检测 IL-17A 对 OvCa 原位成瘤和腹腔转移的影响,结果显示 IL-17A 显著促进小鼠 OvCa 原位成瘤和腹腔转移。与 WT 小鼠相比,IL-17A^{-/-}小鼠肿瘤组织中 p-STAT3、FABP4 蛋白表达显著降低,在动物实验中进一步证实 IL-17A 可通过 IL-17A/IL-17RA/p-STAT3/FABP4 轴促进 OvCa 进展。OvCa 患者临床病理标本显示 IL-17A、FABP4 表达与癌症 FIGO 分期、转移相关,并且两者表达也存在一定相关性。本研究通过动物实验和临床标本证实 IL-17A 可通过激活 STAT3 信号上调 FABP4 表达,进而促进 OvCa 生长转移。IL-17A/IL-17RA/p-STAT3/FABP4 轴可能只是 IL-17A 促进肿瘤进展的原因之一,其他方面的影响也不容忽视。Coffelt 等^[21]报道,IL-17A 可促进中性粒细胞扩增极化,进而抑制 CD8⁺T 细胞活化,促进乳腺癌转移。Li 等^[22]报道 IL-17A 可通过激活酪氨酸蛋白激酶(JAK)、STAT 信号通路促进胃癌

细胞上皮间质转化,导致肿瘤侵袭、转移。虽然 IL-17A 可通过多种机制发挥促肿瘤作用,但本研究证明 IL-17A 可通过 IL-17A/IL-17RA/p-STAT3/FABP4 轴促进 OvCa 生长转移,这至少是一个影响肿瘤生长的重要机制。

综上所述,本研究通过动物实验和临床标本证实 IL-17A 可通过 IL-17A/IL-17RA/p-STAT3/FABP4 轴促进 OvCa 生长转移,为临床干预 OvCa 提供了新的思路和策略。

参考文献:

- [1] NIEMAN K M, KENNY H A, PENICKA C V, et al. Adipocytes promote ovarian cancer metastasis and provide energy for rapid tumor growth[J]. *Nat Med*, 2011, 17(11): 1498–1503.
- [2] LADANYI A, MUKHERJEE A, KENNY H A, et al. Adipocyte-induced CD36 expression drives ovarian cancer progression and metastasis[J]. *Oncogene*, 2018, 37(17): 2285–2301.
- [3] MUKHERJEE A, CHIANG C Y, DAIFOTIS H A, et al. Adipocyte-induced FABP4 expression in ovarian cancer cells promotes metastasis and mediates carboplatin resistance[J]. *Cancer Res*, 2020, 80(8): 1748–1761.
- [4] MUKHERJEE A, BILECZ A J, LENGUEL E. The adipocyte microenvironment and cancer[J]. *Cancer Metastasis Rev*, 2022, 41(3): 575–587.
- [5] GHARPURE K M, PRADEEP S, SANS M, et al. FABP4 as a key determinant of metastatic potential of ovarian cancer[J]. *Nat Commun*, 2018, 9(1): 2923.
- [6] TUCKER S L, GHARPURE K, HERBRICH S M, et al. Molecular biomarkers of residual disease after surgical debulking of high-grade serous ovarian cancer[J]. *Clin Cancer Res*, 2014, 20(12): 3280–3288.
- [7] CHEHIMI M, VIDAL H, ELJAAFARI A. Pathogenic role of IL-17-producing immune cells in obesity, and related inflammatory diseases[J]. *J Clin Med*, 2017, 6(7): 68.
- [8] RAZI S, BARADARAN NOVEIRY B, KESHAVERZ-FATHI M, et al. IL-17 and colorectal cancer: from carcinogenesis to treatment[J]. *Cytokine*, 2019, 116: 7–12.
- [9] MCGEACHY M J, CUA D J, GAFFEN S L. The IL-17 family of cytokines in health and disease[J]. *Immunity*, 2019, 50(4): 892–906.
- [10] LIU C, LIU R, WANG B, et al. Blocking IL-17A enhances tumor response to anti-PD-1 immunotherapy in microsatellite stable colorectal cancer[J]. *J Immunother Cancer*, 2021, 9(1): e001895.
- [11] BILSKA M, PAWLOWSKA A, ZAKRZEWSKA E, et al. Th17 Cells and IL-17 as novel immune targets in ovarian cancer therapy[J]. *J Oncol*, 2020, 2020: 8797683.
- [12] GREENHILL C. Role for IL-17A in adipocyte biology[J]. *Nat Rev Endocrinol*, 2021, 17(7): 383.
- [13] CONNOLLY D C, HENSLEY H H. Xenograft and transgenic mouse models of epithelial ovarian cancer and non invasive imaging modalities to monitor ovarian tumor growth in situ: applications in evaluating novel therapeutic agents[J]. *Curr Protoc Pharmacol*, 2009, 45: chapter14; unit142.
- [14] SIEGEL R L, MILLER K D, FUCHS H E, et al. Cancer statistics, 2022[J]. *CA Cancer J Clin*, 2022, 72(1): 7–33.
- [15] SWIDERSKA J, KOZLOWSKI M, KWIATKOWSKI S, et al. Immunotherapy of ovarian cancer with particular emphasis on the PD-1/PDL-1 as target points[J]. *Cancers (Basel)*, 2021, 13(23): 6063.
- [16] LHEUREUX S, BRAUNSTEIN M, OZA A M. Epithelial ovarian cancer: evolution of management in the era of precision medicine[J]. *CA Cancer J Clin*, 2019, 69(4): 280–304.
- [17] KUROKI L, GUNTUPALLI S R. Treatment of epithelial ovarian cancer[J]. *BMJ*, 2020, 371: m3773.
- [18] DJOUSSE L, GAZIANO J M. Plasma levels of FABP4, but not FABP3, are associated with increased risk of diabetes[J]. *Lipids*, 2012, 47(8): 757–762.
- [19] MAKOWSKI L, BRITTINGHAM K C, REYNOLDS J M, et al. The fatty acid-binding protein, aP2, coordinates macrophage cholesterol trafficking and inflammatory activity. Macrophage expression of aP2 impacts peroxisome proliferator-activated receptor gamma and I κ B kinase activities[J]. *J Biol Chem*, 2005, 280(13): 12888–12895.
- [20] HARJES U, BRIDGES E, GHARPURE K M, et al. Antiangiogenic and tumour inhibitory effects of downregulating tumour endothelial FABP4[J]. *Oncogene*, 2017, 36(7): 912–921.
- [21] COFFELT S B, KERSTEN K, DOORNEBAL C W, et al. IL-17-producing gammadelta T cells and neutrophils conspire to promote breast cancer metastasis[J]. *Nature*, 2015, 522(7556): 345–348.
- [22] LI S, CONG X, GAO H, et al. Tumor-associated neutrophils induce EMT by IL-17a to promote migration and invasion in gastric cancer cells[J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2019, 38(1): 6.

(2022-09-22 收稿)