

引用本文:董旭,韩学昌,邢群智,等.地佐辛对坐骨神经慢性压迫性疼痛大鼠胶质细胞活性及镇痛效能的影响研究[J].安徽医药,2021,25(4):830-833.DOI:10.3969/j.issn.1009-6469.2021.04.048.

◇药物与临床◇



地佐辛对坐骨神经慢性压迫性疼痛大鼠胶质细胞活性及镇痛效能的影响研究

董旭,韩学昌,邢群智,葛军蒲,闫向彪

作者单位:河南科技大学第一附属医院麻醉科,河南 洛阳 471003

摘要: **目的** 探索地佐辛对坐骨神经慢性压迫性疼痛(chronic constriction injury, CCI)大鼠胶质细胞及镇痛效能的影响研究。**方法** 2018年10月至2020年10月,选取雄性SD大鼠40只,采用随机数字表法将大鼠分为四组,每组10只:对照组、模型组 and 低剂量、高剂量组。于手术后即刻至术后7 d,各组每天腹腔注射药物1次:低剂量、高剂量组分别给予浓度为2.5 mg/kg、10 mg/kg的地佐辛,对照组和模型组给予等容积的0.9%生理盐水。于给药7 d后,观察大鼠脊髓L3~4节段胶质细胞特异性蛋白(Iba-1)和胶质原纤维酸性蛋白(GFAP)的蛋白表达水平。造模第1、3、5、7 d测定大鼠病侧机械缩足反射阈(MWT)和热缩足反射潜伏期(TWL)。**结果** 模型组大鼠脊髓中Iba-1及GFAP的蛋白表达水平最高,分别为(0.09±0.003)、(2.12±0.35),对照组水平最低,分别为(0.05±0.001)、(1.01±0.26),两组在Iba-1及GFAP表达水平上的差异有统计学意义($P<0.05$);低剂量组的GFAP表达水平为(1.65±0.12),低于模型组的(2.12±0.35),两组在GFAP表达水平上的差异具有统计学意义($P<0.05$);高剂量组的GFAP表达水平为(1.36±0.25),低于模型组的(2.12±0.35),两组在GFAP表达水平上的差异具有统计学意义($P<0.05$);在各个时间段,低剂量组、高剂量组的MWT和TWL均明显下降,低剂量组的MWT分别为(32.5±6.3、25.4±6.4、42.1±6.4、56.2±3.4),低剂量组的TWL(14.5±0.4、12.6±0.6、13.4±0.9、17.1±0.5),高剂量组的MWT分别为(33.9±7.3、23.5±5.3、41.9±6.3、57.0±5.3),高剂量组的TWL分别为(13.4±0.6、15.5±0.7、18.6±0.2、19.1±0.5),两组在各时间段MWT与TWL的差异均具有统计学意义($P<0.05$);模型组的MWT和TWL分别为(31.5±5.6、29.5±5.1、21.5±4.1、22.5±5.3)与(16.2±3.2、11.5±3.8、9.1±2.3、8.1±1.9),其中MWT均低于低剂量组与高剂量组,差异均具有统计学意义($P<0.05$),TWL均高于低剂量组与高剂量组,差异均具有统计学意义($P<0.05$);对照组的MWT和TWL分别为(63.5±4.4、64.5±3.4、64.6±4.6、64.2±3.8)与(19.5±0.5、19.6±1.0、19.4±0.4、19.7±0.8),与模型组,低剂量组,高剂量组间的差异均具有统计学意义($P<0.05$)。**结论** 地佐辛能有效缓解CCI模型大鼠的神经病理性疼痛,地佐辛可抑制胶质细胞活性及迁移,达到下调GFAP蛋白水平的效果,其镇痛机制可能与此有关。

关键词: 地佐辛; 坐骨神经痛; 神经胶质原纤维酸性蛋白质; 神经反馈; 胶质细胞活性; 镇痛

Effects of dizocine on glial cell activity and analgesic efficacy in rats with chronic compression pain of sciatic nerve

DONG Xu, HAN Xuechang, XING Qunzhi, GE Junpu, YAN Xiangbiao

Author Affiliation: Department of Anesthesiology, First Affiliated Hospital of Henan University of Science and Technology, Luoyang, Henan 471003, China

Abstract: **Objective** To explore the effects of dezocine on the glial cells and analgesic efficacy of rats with chronic constriction injury (CCI) of the sciatic nerve. **Methods** Forty male SD rats were selected from October 2018 to October 2020, and the rats were randomly assigned into 4 groups using a random number table method, with 10 rats in each group: control group, model group, low dose group and high dose group. Immediately after the operation and 7d after the operation, each group was injected intraperitoneally once a day: the low-dose group and the high-dose group were given dizocine with concentrations of 2.5 mg/kg and 10 mg/kg, respectively, and the control group and the model group were given the same volume 0.9% Physiological saline. The expression levels of glial cell-specific protein (iba-1) and glial fibrillary acidic protein (GFAP) in l3-4 segments of rat spinal cord were observed 7 days after administration. The mechanical reflex threshold (MWT) and heat reflex latency (TWL) of the sick side of the rat were determined 1, 3, 5 and 7 days after CCI modeling. **Results** The protein expression levels of Iba-1 and GFAP in the spinal cord of rats in the model group were the highest (0.09±0.003) and (2.12±0.35), respectively, while those in the control group were the lowest (0.05±0.001) and (1.01±0.26), respectively. The differences in the expression levels of Iba-1 and GFAP between the two groups were statistically significant ($P < 0.05$). The expression level of GFAP in the low-dose group was (1.65±0.12), which was lower than that in the model group (2.12±0.35), and the difference in GFAP expression between the two groups was statistically significant ($P < 0.05$). The expression level of GFAP in the high-dose group was (1.36±0.25), which was lower than that in the model group (2.12±0.35), and the difference in GFAP expression between the two groups was statistically significant ($P < 0.05$). The MWT and TWL of the low-dose and high-dose groups decreased significantly

at each time period. The MWT of the low-dose group was (32.5±6.3, 25.4±6.4, 42.1±6.4, 56.2±3.4), the TWL of the low-dose group was (14.5±0.4, 12.6±0.6, 13.4±0.9, 17.1±0.5), and the MWT of the high-dose group was (33.9±7.3, 23.5±5.3, 41.9±6.3, 57.0±5.3). The TWL of the high-dose group were (13.4±0.6, 15.5±0.7, 18.6±0.2, 19.1±0.5), and there were significant differences in MWT and TWL between the two groups at each time period ($P < 0.05$). MWT and TWL of the model group were (31.5±5.6, 29.5±5.1, 21.5±4.1, 22.5±5.3) and (16.2±3.2, 11.5±3.8, 9.1±2.3, 8.1±1.9), respectively. MWT of the model group was lower than that of the low-dose group and the high-dose group, the differences were statistically significant ($P < 0.05$), and TWL was higher than that of the low-dose group and the high-dose group, the differences were statistically significant ($P < 0.05$). The MWT and TWL of the control group were (63.5±4.4, 64.5±3.4, 64.6±4.6, 64.2±3.8) and (19.5±0.5, 19.6±1.0, 19.4±0.4, 19.7±0.8), respectively, and the differences between the model group, the low-dose group and the high-dose group were statistically significant ($P < 0.05$). **Conclusion** Dizocine can effectively alleviate neuropathic pain in CCI model rats. Dizocine can inhibit the activity and migration of glial cells and achieve the effect of down-regulating the level of GFAP protein, and its analgesic mechanism may be related to this.

Key words: Dizocine; Sciatica; Glial fibrillary acidic protein; Neurofeedback; Glial cell activity; Analgesic

地佐辛是苯吗啡烷类衍生物,作为K受体的激动剂,也是 μ 受体的拮抗剂^[1]。近年被认为是一种新型的麻醉剂,其拥有不良反应低,无明显的依赖性等优点^[2]。但目前地佐辛作用于慢性压迫性疼痛(chronic constriction injury, CCI)的药理机制并未非常明确^[3]。胶质细胞具有保护神经元的功能、并为其提供营养、促进代谢、参加突触的形成^[4]。使用麻醉剂后对神经元产生的影响与其胶质细胞有着密切的关联^[5]。本研究通过对大鼠脊髓L3~4节段胶质细胞特异性蛋白(Iba-1)和胶质原纤维酸性蛋白(GFAP)蛋白表达情况进行检测,探讨地佐辛对大鼠胶质细胞活性及镇痛效能的影响。

1 材料与方法

1.1 实验动物 2018年10月至2020年10月,选取雄性SD大鼠40只,体质量范围160~190 g,无任何头部颈部淤血等外伤。由郑州大学实验动物中心提供。动物许可证号SYXK(豫)2020-0008。大鼠自由摄食饮水,饲养温度(25.5±1.0)℃,分笼饲养。本研究符合一般动物实验伦理学原则。本研究过程严格按照国际疼痛研究协会(IASP)关于进行动物疼痛实验的纲要实施完成^[6]。采用随机数字表法将大鼠分四组,每组10只。

1.2 药品、试剂及仪器 Iba-1、GFAP一抗和羊抗兔IgG抗体均来自美国Protein Technology公司,ECL发光试剂盒来自美国Thermo公司。凝胶成像分析仪来自美国BIO-RAD。地佐辛注射液(扬子江药业集团有限公司,批准文号H20080329,批次17054565,每支1 mL/5 mg)。GFAP抗体,美国Abcam公司生产。VonFrey电子测痛仪、热辐射刺激仪。

1.3 实验分组 对照组不进行CCI造模及地佐辛治疗;模型组进行CCI造模但不进行地佐辛治疗;低剂量组CCI造模加低剂量地佐辛治疗;高剂量组CCI造模加高剂量地佐辛治疗。于手术后即刻至术后7 d,低剂量组给予腹腔注射2.5 mg/kg的地佐辛、高剂量组给予腹腔注射10 mg/kg的地佐辛,低剂量

组和高剂量组分别给予2.5 mg/kg、10 mg/kg的地佐辛,稀释至5 mL给予腹腔注射,对照组和模型组给予腹腔注射等容积的0.9%生理盐水。

1.4 大鼠CCI模型的制作^[7] 用10%的水合氯醛4 μ L/g对大鼠进行腹腔注射麻醉,麻醉后,经股二头肌将大鼠的左后肢位于大腿中后部分的皮肤进行间隙钝性分离,暴露大鼠的坐骨神经干后将其与周围的软组织进行分离;定位于坐骨神经分成三股前的主干部位,大致在游离神经7 mm左右,轻度地对坐骨神经进行结扎,最优以神经外膜收到轻度的压力;强度的标准为引起小腿肌肉颤动。一共对其坐骨神经进行4道结扎,其间距为1 mm。此时制作成CCI模型,在手术结束之前对大鼠前肢进行肌肉注射4万单位青霉素。为保证本研究中的模型制作中尽量不出现偏差,均采取专人进行模型制作,结扎时大鼠侧肢出现轻微的抽动且术侧后爪无法承受重力,足趾开始并拢且呈轻度外翻或出现自发性缩足反射等现象为模型制作成功。对照组对大鼠的坐骨神经只进行对空气暴露,不进行神经结扎。

1.5 测定指标与方法

1.5.1 机械缩足反射阈值及热缩足反射潜伏期的测定^[8] ①使用VonFrey电子测痛仪对大鼠的病侧后足的机械疼痛阈值(Mechanical withdrawal threshold, MWT)进行测量:将大鼠放置于笼内,等待30 min使其适应环境镇定下来后使用VonFrey电子测痛仪针尖对大鼠的病侧足后第三、四组的足底皮肤进行垂直刺激,当大鼠出现极为迅速的缩足会舔足系列动作则记为大鼠的MWT。②使用热辐射刺激仪对大鼠的热缩足反射潜伏期(Thermal paw withdrawal latency, TWL)进行测量;使用光斑直径0.8 cm的热辐射刺激仪按照Hargreaves法对大鼠的足底中后处1/3处进行照射,当大鼠出现收足、舔足、抬足甚至撕咬即认为大鼠的TWL。

对建模后大鼠第1 d、第3 d、第5 d、第7 d的MWT、TWL进行测定及比较,间隔3分钟进行1次测

定,将切断时间设置为20 s。

1.5.2 Western blotting 检测大鼠 L3~4 节段脊髓 Iba-1、GFAP 蛋白表达水平 对大鼠的 MWT 及 TWL 结束测量后,使用 10% 水合氯醛(400 mg/kg)对大鼠进行腹腔注射麻醉后快速断头,使其冰浴的同时迅速取其 L3~4 节段脊髓,用液氮进行保存,加入含有磷酸蛋白酶抑制剂的 SDS 缓冲液(按每毫克组织 10 mL/mg 标准)和蛋白酶,将样品用沸水浴 5 min 后进行 BCA 法测定蛋白浓度,应用湿转膜法将等量采用电泳的蛋白样品 10%SDS-聚丙烯酰胺转移到 PVDF 膜。用 5% 的脱脂牛奶进行 60 min 的封闭后在 4 ℃ 分别用 1:200 的一抗 Iba-1 及 1:2 000 的 GFAP 在摇床孵育过夜。洗膜后用 ECL 发光试剂盒在凝胶成像分析仪处理。用 Image Lab 软件条带的平均灰度值代表 GFAP 蛋白表达水平。

1.6 统计学方法 使用 SPSS 21.00 进行数据分析。观测资料主要是计量资料,均通过正态性检验,以 $\bar{x} \pm s$ 表示。多组比较采用单因素方差分析+两两比较 LSD-*t* 检验,多时点观测资料则采用两因素重复测量方差分析+组间两两比较 LSD-*t* 检验+时间两两比较差值 *t* 检验。检验水准 $\alpha=0.05$,时间两两比较的检验水准按 Bonferroni 校正法进行调整。

2 结果

2.1 各组大鼠脊髓中 Iba-1 及 GFAP 的表达水平 单因素方差分析,各指标整体差异有统计学意义($P<0.05$)。多重比较并结合主要数据分析:大鼠脊髓中 Iba-1 及 GFAP 的表达水平模型组蛋白表达水平最高,对照组水平最低。对照组与模型组,低、高剂量组与模型组的 Iba-1、GFAP 表达水平,均差异有统计学意义(均 $P<0.05$),见表 1,图 1。

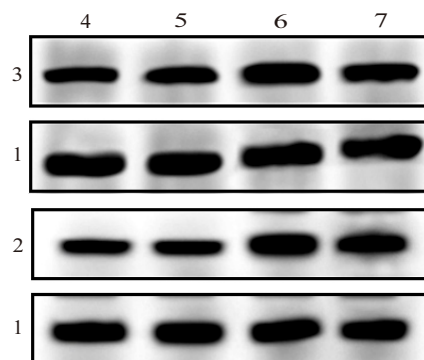
2.2 各组大鼠疼痛行为学检测结果 整体比较(两因素重复测量方差分析)知:各指标组间差异、时间差异及交互作用均差异有统计学意义($P<0.05$)。两两精细比较:低剂量组、高剂量组在 CCI 造模后不同时间段出现了行走时抬足、跛行、足外翻等行为学变

表 1 各组大鼠脊髓中 Iba-1 及 GFAP 的表达水平比较/ $\bar{x} \pm s$

组别	鼠数	Iba-1 表达水平	GFAP 的表达水平
对照组	10	0.05±0.001	1.01±0.26
模型组	10	0.09±0.003 ^①	2.12±0.35 ^①
低剂量组	10	0.07±0.002 ^{①②}	1.65±0.12 ^{①②}
高剂量组	10	0.05±0.006 ^{②③}	1.36±0.25 ^{①②③}
F 值		293.333	30.044
P 值		0.000	0.000

注:Iba-1 为胶质细胞特异性蛋白,GFAP 为胶质原纤维酸性蛋白。

①与对照组比较, $P<0.05$ 。②与模型组比较, $P<0.05$ 。③与低剂量组比较, $P<0.05$ 。



注:1—甘油醛-3-磷酸脱氢酶;2—胶质原纤维酸性蛋白;3—胶质细胞特异性蛋白;4—对照组;5—模型组;6—低剂量组;7—高剂量组。

图 1 Western blotting 检测各组大鼠脊髓 Iba-1、GFAP 的蛋白表达电泳图

化,MWT 和 TWL 均明显下降($P<0.05$);与模型组相较,低剂量组和高剂量组在接受地佐辛治疗后行为学变化有缓解,MWT 和 TWL 回升($P<0.05$),高剂量组同时间点 TWL 高于低剂量组($P<0.05$),而两组同时间点 MWT 差异无统计学意义($P>0.05$)。见表 2。

3 讨论

神经性疼痛(Neuropathic pain, NPP)是一种当感觉神经系统受到损伤或者发生疾病时对躯体直接发生的疼痛^[9]。表现为痛觉过敏、感觉异常、自发性疼痛、异常疼痛等^[10]。胶质细胞是一种支持细胞,分布于中枢和周围神经系统,支持并引导神经元迁移,对整个神经系统的修复和再生进行参与,

表 2 各组大鼠疼痛行为学检测结果 ($n=10$)/ $\bar{x} \pm s$

组别	鼠数	MWT				TWL			
		D1	D3	D5	D7	D1	D3	D5	D7
对照组	10	63.5±4.4	64.5±3.4	64.6±4.6	64.2±3.8	19.5±0.5	19.6±1.0	19.4±0.4	19.7±0.8
模型组	10	31.5±5.6 ^{①④}	29.5±5.1 ^{①④}	21.5±4.1 ^{①④}	22.5±5.3 ^{①④}	16.2±3.2 ^{①④}	11.5±3.8 ^{①④}	9.1±2.3 ^{①④}	8.1±1.9 ^{①④}
低剂量组	10	32.5±6.3 ^{①④}	25.4±6.4 ^{①④}	42.1±6.4 ^{①②④}	56.2±3.4 ^{①②④}	14.5±0.4 ^{①④}	12.6±0.6 ^{①④}	13.4±0.9 ^{①②④}	17.1±0.5 ^{①②④}
高剂量组	10	33.9±7.3 ^{①④}	23.5±5.3 ^{①②④}	41.9±6.3 ^{①②④}	57.0±5.3 ^{①②④}	13.4±0.6 ^{①②③④}	15.5±0.7 ^{①②③④}	18.6±0.2 ^{①②③④}	19.1±0.5 ^{②③}
HF 系数		0.690 4				0.505 2			
组间 F, P 值		291.349, 0.000				168.003, 0.000			
时间 F, P 值		176.877, 0.000				76.922, 0.000			
交互 F, P 值		43.210, 0.000				41.665, 0.000			

注:MWT 为机械疼痛阈值,TWL 为热缩足反射潜伏期。

①与对照组比较, $P<0.05$ 。②与模型组比较, $P<0.05$ 。③与低剂量组比较, $P<0.05$ 。④与组内 D1 时间点比较, $P<0.017$ 。

并且参与机体的免疫应答,在形成髓鞘、血脑屏障、物质代谢及维持细胞外钾离子的浓度等方面进行作用。胶质细胞与神经元的关系在神经生物学科成为最新热点,神经元在大脑中承担着重要作用,参与释放递质等影响突触活动^[11]。近年来大量的研究证实胶质细胞与NPP有关。王伍超等^[12]研究显示,胶质细胞在活化后会对神经炎症及免疫反应进行主导,而神经炎症和免疫反应在NPP的发生和维持上发挥着重要作用,发生神经损伤后的胶质细胞神经外周到中枢释放出细胞因子及炎性因子加速NPP发生,因此调控胶质细胞活性或许是研究NPP的新方向。

地佐辛是阿片受体混合激动-拮抗剂,具有优越的镇痛作用。其成瘾性较小、对呼吸抑制作用较弱,在人体内吸收快、分布快,因此镇痛起效快、镇痛久等优点^[13]。临床上将其广泛在术后镇痛、全麻诱导等方面运用^[14]。Welch等^[15]研究在大鼠上建立CCI模型后给予吗啡会升高大鼠在术后的MWT,以此来推测地佐辛是否有类似作用。而鲍杨等^[16]的研究结果显示,术后切口痛大鼠给予地佐辛能明显升高痛阈,认为地佐辛对术后切口痛具有明显的镇痛作用。而本研究中大鼠在建模后的MWT、TWL水平均较低,在两种不同剂量地佐辛干预下的MWT、TWL均呈现出一定水平的升高,与Welch等及李海鸥的研究结论类似,提示地佐辛对疼痛及神经反射有着抑制作用,且还发现高剂量和低剂量对升高MWT、TWL水平均有效果,但两种剂量对MWT影响间的差异并无统计学意义,高剂量的地佐辛可能并不能提高对坐骨神经压迫性疼痛的抑制作用。Iba-1为胶质细胞特异性蛋白,其阳性蛋白水平可以作为胶质细胞的标志蛋白之一^[17];GFAP是胶质细胞的标志蛋白及主要骨架成分^[18]。GFAP可以在一定程度上反映胶质细胞活化的状态,因此可以检测GFAP水平来对胶质细胞进行监测^[19]。本研究结果显示,对照组GFAP荧光强度值高于模型组、低剂量组及高剂量组,表明地佐辛可抑制大鼠脊髓胶质细胞GFAP的表达。同时,随着地佐辛剂量的增加,GFAP荧光强度值开始降低,地佐辛发挥镇痛作用可能与抑制胶质细胞的活化有关联。

综上所述,本研究推测地佐辛在镇痛的同时又可抑制脊髓胶质细胞的活化:抑制大鼠脊髓胶质细胞活性以至下调GFAP的表达,但由于NPP的发病机制复杂,应扩大大鼠数量进行多中心合作以此探索地佐辛在治疗NPP的机制及临床效果。

参考文献

[1] 王永宏,孙双春,延育强,等.地佐辛对大鼠皮层星形胶质细胞

的影响[J].中国医学装备,2018,15(10):138-141.

[2] 张立民,李睿,孙文波,等.地佐辛对 β 淀粉样多肽处理的原代大鼠皮质星形胶质细胞的保护作用[J].临床麻醉学杂志,2018,34(2):175-178.

[3] 王琪,王金保,蔡增华,等.氯诺昔康联合地佐辛超前镇痛对切口痛大鼠模型的影响及其可能作用机制研究[J].临床和实验医学杂志,2018,17(10):1009-1011.

[4] 马悦,李文,李振舒,等.新生大鼠大脑皮质星形胶质细胞纯化及培养方法的改进[J].卫生研究,2019(5):795-798.

[5] 郭娟,郝海智,董海龙.中枢内星形胶质细胞源性乳酸对神经元的“容积递质”样影响作用的研究进展[J].神经解剖学杂志,2017,33(6):767-770.

[6] 吴志伟,宋朋飞,朱清广,等.神经病理性疼痛动物模型研究进展[J].中华中医药学刊,2019,37(5):1083-1087.

[7] Bennett GJ, Xie YK. A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man[J]. Pain, 1988, 33(1): 87-107.

[8] 林剑鸣,罗琳琅,郑燕茹,等.地佐辛对坐骨神经慢性压迫性疼痛大鼠脊髓胶质纤维酸性蛋白表达的影响[J].中国临床药理学杂志,2017,33(23):2404-2406.

[9] 苏健生,范崇玖,方胜春,等.大鼠脊髓损伤后神经性疼痛差异化形成的行为学研究[J].中国煤炭工业医学杂志,2018,21(1):78-82.

[10] 尧永华,刘威力.胸腔热灌注治疗中应用右美托咪定复合地佐辛的临床观察[J].中华生物医学工程杂志,2014,20(2):146-149.

[11] 周兴,何军民,胡忠义,等.地佐辛复合地塞米松对腋路臂丛神经阻滞效果的影响[J].重庆医学,2016,45(7):973-975.

[12] 王伍超,郭晓丽,胡理.神经胶质细胞活化在神经病理性疼痛中的作用研究进展[J].中国疼痛医学杂志,2017,23(8):594-597.

[13] 齐万红,邵琳,张培华.不同剂量地佐辛预防性镇痛对腰椎管狭窄手术患者复苏质量和术后早期疼痛程度的影响[J].广东医学,2016,37(24):3746-3750.

[14] 边秀梅.地佐辛应用在神经外科患者术后镇痛中的临床效果[J].中国现代药物应用,2016,10(9):127-128.

[15] Welch RD, Ellis M, Lewis LM, et al. Modeling the kinetics of serum glial fibrillary acidic protein, ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase-L1, and S100B concentrations in patients with traumatic brain injury[J]. J Neurotrauma, 2017, 34(11): 1957-1971.

[16] 鲍杨,焦英甫,俞卫锋.超低剂量纳洛酮对地佐辛治疗切口痛模型大鼠术后疼痛效能的影响[J].江苏大学学报(医学版),2019,29(1):42-44.

[17] 姚杰,刘斐,高艳,等.曲马多复合加巴喷丁对糖尿病神经病理性疼痛大鼠脊髓胶质细胞活化的影响[J].实用药物与临床,2019,22(8):794-798.

[18] Magruder JT, Hibino N, Collica S, et al. Association of nadir oxygen delivery on cardiopulmonary bypass with serum glial fibrillary acid protein levels in paediatric heart surgery patients[J]. Interact Cardiovasc Thorac Surg, 2016, 23(4): 531-537.

[19] 沈慧,许琪.两种体外培养星形胶质细胞的比较[J].中国医学科学院学报,2019,41(4):524-528.

(收稿日期:2020-02-15,修回日期:2020-04-19)