

• 论著-研究报告 •

鳃-耳-肾综合征家系 *EYA1* 基因一个新的 外显子重复变异*

李隽¹ 赵培伟² 夏志杰¹ 姚薇¹ 魏幼华¹ 郝丽丽¹ 夏忠芳¹ 何学莲²

[摘要] 目的:为一临床诊断为鳃-耳-肾综合征的中国家系寻找致病基因及位点。方法:回顾性分析 1 个鳃-耳-肾综合征核心家系的临床特征及治疗经过;应用全外显子测序技术(WES)对先证者进行全外显子水平突变分析,其中部分外显子缺失/重复利用荧光定量 PCR 方法(Realtime-PCR)验证。结果:该家系中先证者,男,4 岁 1 个月,有耳聋、内耳和中耳结构畸形、耳前瘘管、鳃裂瘘管和肾萎缩临床表型,符合鳃-耳-肾综合征的临床诊断,父、母均无类似表型。WES 检测及荧光定量 PCR 验证发现患者 *EYA1* 基因外显子 13~18 存在单倍重复,其父母未见异常。外科手术切除双侧耳前及鳃裂瘘管,术后恢复较好,佩戴助听器辅助听力。结论:本研究寻找到一种新的 *EYA1* 基因外显子重复变异致鳃-耳-肾综合征,拓展了 *EYA1* 基因的突变谱。

[关键词] 鳃-耳-肾综合征; *EYA1* 基因;拷贝数异常

DOI:10.13201/j.issn.2096-7993.2021.07.007

[中图分类号] R764 **[文献标志码]** A

Novel duplication mutation of *EYA1* causes branchio-oto-renal syndrome in a Chinese family

LI Jun¹ ZHAO Peiwei² XIA Zhijie¹ YAO Wei¹ WEI Youhua¹
HAO Lili¹ XIA Zhongfan¹ HE Xuelian²

(¹Department of Otorhinolaryngology, Wuhan Children's Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan, 430016, China; ²Precision Medical Laboratory, Wuhan Children's Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology)

Corresponding author: WEI Youhua, E-mail: w82828114@163.com

Abstract Objective: To identify novel genetic causes of branchio-oto-renal (BOR) syndrome in a Chinese family. **Methods:** Clinical characteristics and treatment of a family with a BOR syndrome were retrospectively analyzed. Genetic analysis was conducted by trio whole exome sequencing (WES) and the duplicated exons were verified by fluorescence quantitative PCR (real-time PCR). **Results:** In this family, the affected individual had deafness, structural malformation of inner ear and middle ear, pre-auricular fistula, cervical fistula and renal atrophy consistent with the clinical diagnosis of BOR syndrome. Neither the father nor the mother had similar phenotype. WES and quantitative fluorescent PCR revealed that the patient had a *de novo* partial duplication involving exons 13 to 18 of *EYA1* gene. This mutation has not been reported in literature or any database. Bilateral pre-auricular fistulas and cervical fistulas were surgically removed and the surgery wound healed well, while hearing AIDS had been worn to assist hearing. **Conclusion:** This study is the first to detect a novel *de novo* partial duplication (ex-

*基金项目:湖北省自然科学基金面上项目(No:2014CKB511)

¹华中科技大学同济医学院附属武汉儿童医院耳鼻咽喉科(武汉,430016)

²华中科技大学同济医学院附属武汉儿童医院精准医学实验室
通信作者:魏幼华,E-mail:w82828114@163.com

[17] Jones S,Spielmann P. Device profile of the Bonebridge bone conduction implant system in hearing loss:an overview of its safety and efficacy[J]. Expert Rev Med Devices,2020,17(10):983-992.

[18] Pittman AL. Bone Conduction Amplification in Children;Stimulation via a Percutaneous Abutment versus a Transcutaneous Softband [J]. Ear Hear, 2019, 40 (6):1307-1315.

[19] Fan Y, Niu X, Chen Y, et al. Long-term evaluation of

development in patients with bilateral microtia using softband bone conducted hearing devices[J]. Int J Pediatr Otorhinolaryngol,2020,138:110367.

[20] Wang Y, Xing W, Liu T, et al. Simultaneous auricular reconstruction combined with bone bridge implantation-optimal surgical techniques in bilateral microtia with severe hearing impairment[J]. Int J Pediatr Otorhinolaryngol,2018,113:82-87.

(收稿日期:2021-03-22)

ons13-18) of *EYA1* gene leading to BOR syndrome, and expands the mutant spectrum of *EYA1* gene in Chinese population.

Key words branchio-oto-renal syndrome; *EYA1* gene; copy number variation

鳃-耳-肾综合征 (branchio-oto-renal syndrome) 为常染色体显性遗传性疾病, 1975 年 Melnick 等首次报道提出这一概念, 流行病学研究显示该综合征患病率约为 1 : 40 000, 在重度及极重度聋儿中的发病率约为 2%^[1], 为综合征性的耳聋。临床表现多样, 主要包括听力障碍、耳部畸形、鳃裂发育异常、耳前瘘管及肾脏疾病, 如肾萎缩、多囊肾, 同一家系中不同患者的临床表型及严重程度也可出现极大差异, 具有高度异质性, 因此, 容易出现临床误诊^[2]。

临床诊断结合分子诊断已经成为目前综合征类疾病诊断的重要手段^[3]。研究发现 *EYA1*、*SIX1* 和 *SIX5* 等基因异常与鳃-耳-肾综合征相关, 其中 *EYA1* 是最常见的致病基因, 约 40% 的鳃-耳-肾综合征患者可检测到在 *EYA1* 基因异常^[4]。现已报道 240 种 *EYA1* 基因突变 (HGMD database 截止时间为 2020 年 4 月), 主要突变类型为错义突变或碱基插入/缺失突变^[5-11], 而 *EYA1* 基因部分外显子重复变异罕见报道。本研究结合我院 1 例鳃-耳-肾综合征家系的临床表型和分子诊断特点, 报道了一种新的 *EYA1* 基因外显子重复变异致鳃-耳-肾综合征, 进一步加强对该疾病分子诊断的认识。

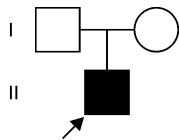
1 资料与方法

1.1 临床资料

先证者, 男性, 4 岁 1 个月, 因双侧耳前瘘管及颈部瘘管、言语发育迟缓来我院就诊。所有研究对象均签署了知情同意书, 未成年人由监护人签署知情同意书。

1.2 病史采集和体格检查

对先证者及核心家系成员进行完整的病史采集和系统的体格检查, 绘制家系系谱图 (图 1)。



箭头示先证者。
图 1 家系系谱图

1.3 听力学检查及其他检查

对先证者进行听性脑干诱发电位 (骨导 + 气导)、耳声发射、多频稳态和声导抗, 对其他家系成员进行纯音测听检测, 根据 WHO (1997) 听力损失标准评估听力损失程度。其他检查包括内耳 CT、头颈部 CT、肾脏超声、肾动态显像 GFR + 延迟显

像、肾功能和常规血液分析 (血常规、肝肾功能、凝血相)。

1.4 高通量测序检测致病基因

经家属知情同意后取患者及其父母外周血各 2 mL, 采用外周血基因组 DNA 提取试剂盒 (Omega 公司) 提取患者 DNA, 并测定 DNA 的浓度。采用 IDT The xGen Exome Research Panel v2.0 全外显子捕获芯片及 Illumina 高通量测序仪 (测序仪型号: Novaseq 6000, 读长: PE150) 进行 trio 全外显子组测序。测序的原始数据与参考基因组比对后, 采用 GATK 以及 VarScan 软件进行 SNP\Indel 的识别、注释并利用生物信息学软件评定突变位点的生物学影响。结合临床表型利用 Clinvar、HGMD、pubmed 等数据库对给出的突变数据进行再次分析, 确定致病突变位点。致病基因筛选的生物信息分析过程见图 2。

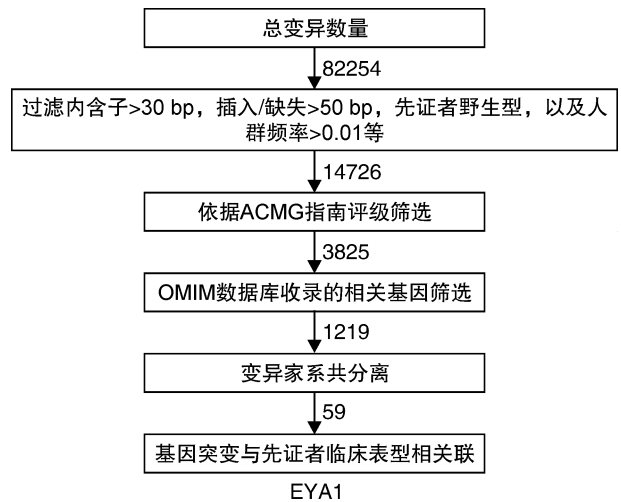


图 2 致病基因筛选的生物信息分析流程图

1.5 荧光定量 PCR 验证 *EYA1* 基因外显子重复

根据 WES 分析的结果, 选择拷贝数异常区域内的 *EYA1* 基因进行荧光定量分析。从 NCBI 数据库中下载 *EYA1* 基因的序列, 分别针对 *EYA1* 基因外显子 13, 15 和 18 设计引物并选择单拷贝基因 ABL 为内参基因。利用 SYBR 荧光染料, 在 ABI7500 荧光定量 PCR 仪器上进行 *EYA1* 基因的拷贝数相对定量检测。荧光定量 PCR 每次实验每个标本设置 3 个重复, 该实验做了 3 次。

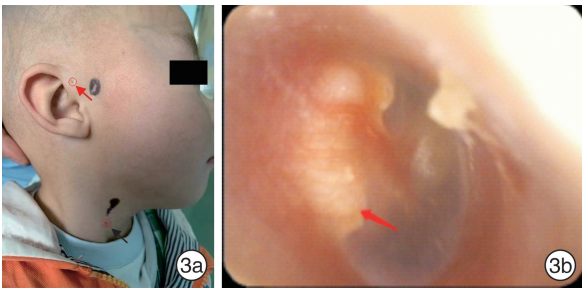
1.6 外科治疗和病理检查

外科手术切除双侧耳前瘘管及颈部瘘管, 切除组织送病理检查。

2 结果

2.1 先证者及家系表型

先证者言语发育迟缓不会说话;耳廓外观正常;双侧耳轮角前可见针尖大小瘘口;颈前甲状软骨水平双侧胸锁乳突肌前缘可见对称性瘘口,挤压有脓液溢出(图 3a);耳内镜检查可见鼓膜完整,透亮,锤骨标志异常(图 3b)。父母体格检查均未见耳廓畸形、耳前瘘口及颈部瘘口;纯音测听双耳平均听阈为 20 dB HL,正常听阈;肾脏超声及肾功能检查未见异常。

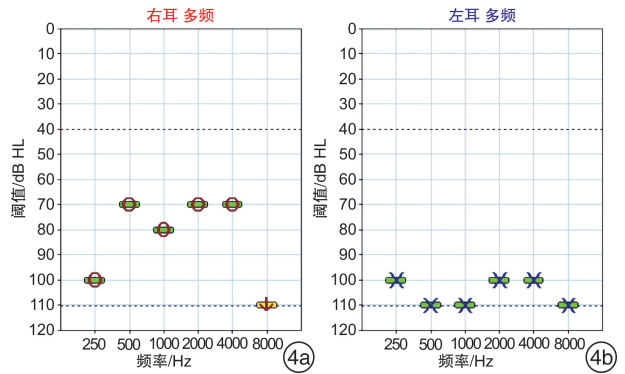


3a:耳轮脚前可见耳前瘘管(箭头所示);胸锁乳突肌前缘可见鳃裂瘘管(箭头所示);3b:耳内镜下可见锤骨柄和锤骨短突形态异常(箭头所示)。

图 3 先证者临床体征

2.1.1 听力检查结果 声导抗双耳“B”型,脑干听觉诱发电位(气导)左耳阈值为 95 dB nHL,右耳阈值为 65 dB nHL;脑干听觉诱发电位(骨导)左耳 30 dB nHL 未引出,右耳阈值为 20 dB nHL;耳声发射双耳各频率均未引出。多频稳态结果见图

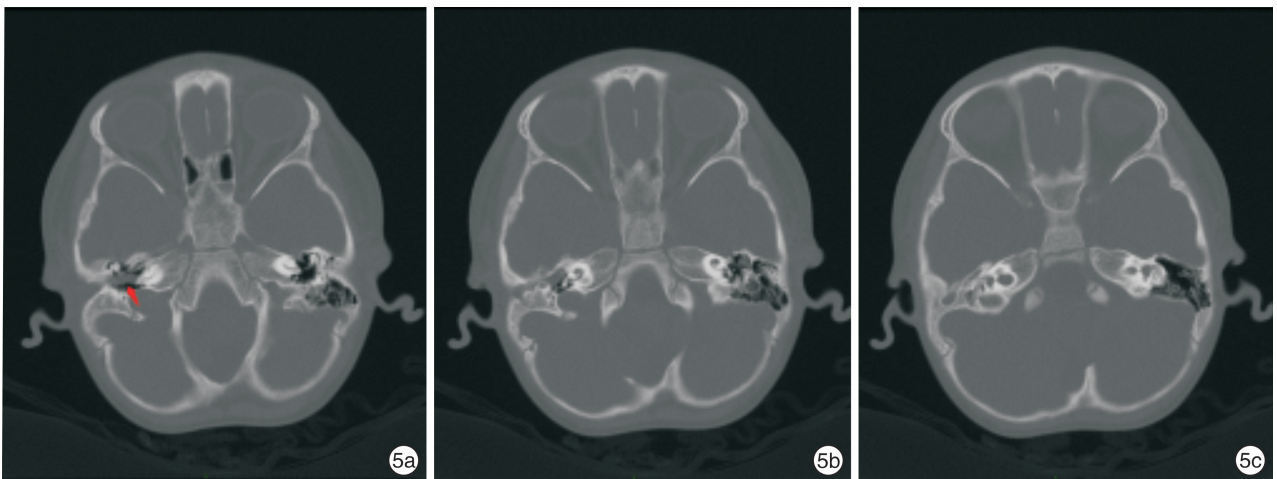
4,显示右耳重度听力损失,左耳极重度听力损失。



4a:右耳各频段阈值 250 Hz 110 dB HL;500 Hz 70 dB HL;1 kHz 80 dB HL;2 kHz 70 dB HL;4 kHz 70 dB HL;4b:左耳各频段阈值 250 Hz 100 dB HL;500 Hz 110 dB HL;1 kHz 110 dB HL;2 kHz 100 dB HL;4 kHz 100 dB HL。

图 4 先证者多频稳态

2.1.2 颞骨及头颈部 CT 平扫轴位、多平面重组及三维容积再现 双侧听小骨形态及位置异常,右侧中耳腔条片状软组织密度影(图 5a)。双侧耳蜗呈一圈半(图 5b),双后半规管缺如(图 5c),双侧内听道对称。双侧前庭导水管未见扩大。双侧颈部皮肤局部凹陷,皮下未见明显软组织肿块影。喉腔通畅,两侧梨状窝基本对称,未见闭锁、填塞及明显腔内占位梗阻征象。增强后扫描,颈部未见明显异常强化影。



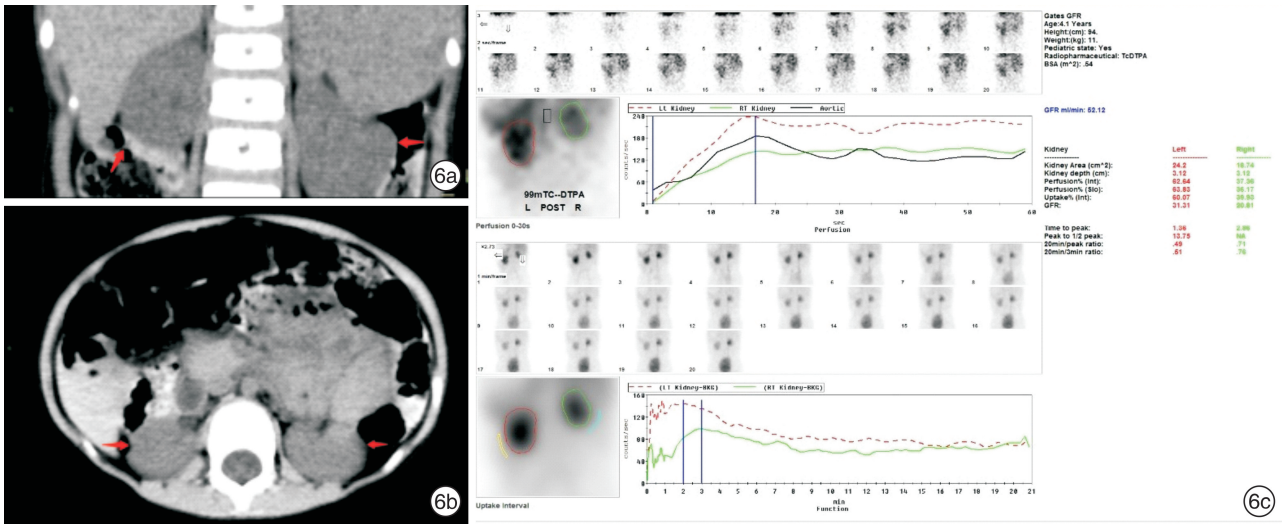
5a:双侧听小骨形态及位置异常,“↑”示右侧中耳腔条片状软组织密度影;5b:耳蜗呈一圈半;5c:后半规管缺如。

图 5 先证者颞骨 CT

2.1.3 肾动态显像 GFR+延迟显像 双肾较小,位置正常(图 6a、6b),右肾肾小球滤过功能明显减低,右肾 GFR 为 20.81 mL/min;右上尿路排泄延缓,延迟显像右肾内显像剂少许滞留。左肾血流灌

注正常,肾小球滤过功能轻度减低,左肾 GFR 为 31.31 mL/min;左上尿路排泄稍延缓(图 6c)。

2.1.4 肾功能 尿素氮升高,肌酐和尿酸正常,血常规检查未见异常。



6a:CT 冠状位,“↑”示双肾形态较小,位置正常;6b:CT 轴位,“↑”示双肾形态较小;6c:双肾动态 GFR。

图 6 肾动态显像 GFR+延迟显像

2.2 WES 检测结果

全外显子测序结果显示先证者的 *EYA1* 基因 (NM_000503.5)13~18 外显子拷贝数异常(图 7)。将先证者及其父母和正常对照样本进行荧光定量 PCR 验证(图 8),结果发现先证者 *EYA1* 基因的 13~18 外显子的拷贝数与正常对照的比值为 1.5,提示先证者 *EYA1* 基因的 13~18 外显子单倍重复;先证者父母 *EYA1* 基因的 13~18 外显子的拷贝数与正常对照的比值约为 1,提示患者父母未见异常。检索文献及数据库发现该变异在千人基因组、Genome AD 等数据库中均未收录。根据 ACMG 指南该突变为致病性改变(①强致病证据 PVS1-S;非 NMD 区域的 LOF 突变;②强致病证据 PS2;经双亲验证的新发变异;③中等致病证据 PM2;所有正常人群数据库频率小于 0.0005)。

2.3 相同突变类型鳃-耳-肾综合征的临床表型及差异

本研究患者 *EYA1* 基因外显子 13~18 存在重复。经检索中国期刊全文数据库及 NCBI 数据库(截止到 2020 年 12 月 20 日)发现,目前国内外仅有一篇文章报道了一个家系中 10 例患者(巴西人群)的 *EYA1* 基因外显子 4~10 存在重复,家系中的患者仅存在鳃耳异常,未见肾脏异常。比较分析发现 *EYA1* 基因外显子重复导致的鳃-耳-肾综合征与其他突变类型导致的患者临床表型无明显差异。

2.4 治疗及预后

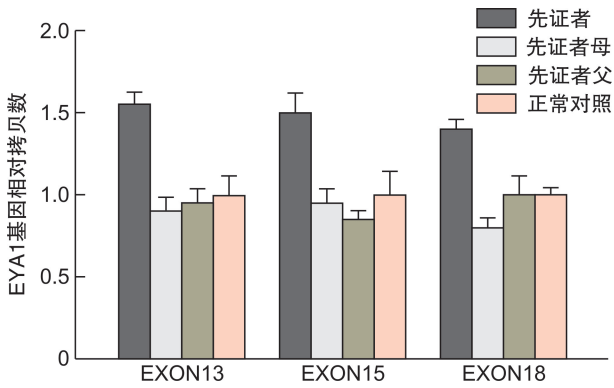
切除组织送病理检查符合瘻管改变,伤口愈合良好,无复发;助听器辅助听力:采用听觉能力数量评估(声场)和言语频谱图(香蕉图)评价法。助听阈结果分析:250 Hz 30 dB HL;500 Hz 35 dB HL;1000 Hz 40 dB HL;2000 Hz 40 dB HL;4000

Hz 45 dB HL,患儿不能久坐,所得结果为相对好耳(右耳)的助听后听阈。



先证者 *EYA1* 基因的 13~18 外显子的拷贝数与正常对照的比值为 1.5;先证者父母 *EYA1* 基因的 13~18 外显子的拷贝数与正常对照的比值约为 1。

图 7 全外显子测序结果



先证者 *EYA1* 基因的 13、15、18 外显子的拷贝数与正常对照的比值为 1.5; 先证者父母 *EYA1* 基因的 13、15、18 外显子的拷贝数与正常对照的比值约为 1。

图 8 荧光定量 PCR 验证结果

3 讨论

鳃-耳-肾综合征谱系是罕见的常染色体显性遗传性疾病,外显率很高,临床表现异质性大,目前临床广泛应用的是 Chang 等^[4]提出的鳃-耳-肾综合征谱系临床诊断标准。提出主要临床表现为:①鳃裂瘘管或囊肿;②耳聋;③耳前瘘管;④肾脏畸形。次要临床表现为:①外耳异常;②中耳畸形;③内耳异常;④其他:面部不对称或味觉异常等。患者临床表现必须满足以下 3 个条件之一方可诊断为鳃-耳-肾综合征谱系:①至少 3 项主要表现;②具有 2 项主要表现,并同时有至少 2 项次要表现;③具备 1 项主要表现,且有至少 1 个一级亲属中有鳃-耳-肾综合征谱系患者。本家系患者外观可见双侧耳前瘘管合并颈部瘘管,手术切除颈部瘘管送病理检查显示符合鳃裂瘘管改变,结合术中追踪瘘管至颌下腺考虑为第二鳃裂瘘管;听力学检查 ASSR 左耳平均听阈 105 dB HL、右耳平均听阈 75 dB HL,依据 WHO 的听力损失评估标准判定左耳极重度听力损失、右耳重度听力损失;听性脑干诱发电位结果显示右耳气导阈值 65 dB nHL、骨导阈值 20 dB nHL,参照本听力室正常参考值^[12]显示骨、气导阈值均升高,且存在骨气导差,结合颞骨 CT 结果耳蜗畸形及听骨链畸形考虑右耳为混合性聋,左耳气导阈值 95 dB nHL、骨导阈值 30 dB nHL 未引出,考虑左耳为感音神经性聋或混合性聋;肾动态显像 GFR 及肾功能检查显示患儿肾萎缩、肾小球滤过功能下降。可见该患儿具有全部 4 项主要临床表现;另外患儿颞骨 CT 显示内耳、中耳存在结构畸形同时还具备 2 项次要表现。故依据 Chang 等^[4]提出的临床诊断标准,该家系符合鳃-耳-肾综合征谱系的临床诊断。

随着二代测序技术的迅猛发展,高通量测序技术已成为遗传性疾病有效的分子诊断工具^[3,13],本研究利用高通量测序技术对先证者及其父母进行

全外显子测序,发现患者 *EYA1* 基因外显子 13~18 外显子的拷贝数与正常对照的比值为 1.5,提示单倍重复,重复大小为 17.7 kb;患者父母该区域未见异常。拷贝数正常的家系成员均无临床表型,先证者及其家系成员表型及基因型存在共分离。

EYA1 基因是 EYA 家族中的一员,属于人类同源的“果蝇眼缺失”基因,存在于人类及果蝇等多种生物体,该基因定位于 8q13.3 区域^[14],是鳃弓和鳃板以及内耳毛细胞和神经元形成的关键,在肾脏的早期发育中也起着重要的作用^[15-16]。*EYA1* 蛋白是一种双功能转录因子,N 端是一个与 SIX1 和 DACH 相互作用的转录共激活域;C 端是含有 271 个氨基酸的 Eya 域(ED),使 SIX1-DACH 复合体去磷酸化从抑制状态转变为激活状态^[17-19]。在生物体内分析显示 ED 突变损害 *EYA1* 蛋白产物的催化活性(即去磷酸化作用),这表明磷酸酶活性的丧失可能会导致 *EYA1* 活性受损并进而导致鳃-耳-肾综合征表型^[20]。本研究中的患者检测到 *EYA1* 基因外显子 13~18 单倍重复(chr8:72111574-72129258),大小为 17.7 kb,该异常在正常人群数据库中未见收录。我们推测重复的最可能位置与野生型基因的染色体位置重叠,可能存在两种重复方式:一种是串联的,第 18 外显子后面是第 13~18 外显子的额外拷贝,或者是颠倒位置即第 18 外显子后面是第 18 外显子到第 13 外显子的额外拷贝;在这两种情况均可能改变 *EYA1* 基因阅读框,使 *EYA1* 蛋白不能形成正常的 ED 域,进而破坏 *EYA1* 蛋白的功能。

Brophy 等^[21]在 32 例鳃-耳-肾综合征患者中发现 12.5% 的患者存在染色体 8q13.3q 重复缺失,Dantas 等^[22]首次报道了 *EYA1* 外显子 4~10 重复增加致一个巴西鳃耳综合征家系,家系中的患者无肾脏表型仅有鳃和耳的症状;而本研究中的患者具有典型的鳃-耳-肾综合征表型,推测可能的原因是基因内部外显子重复差异对 *EYA1* 蛋白功能的影响不同,需要进一步的功能研究。笔者尚未见类似于本案例所描述的重复现象导致鳃-耳-肾综合征的相关报道,因此,本例患者表型与其他关于 *EYA1* 基因单倍重复突变的报告比较是有限的。

国内外报道大约 240 种 *EYA1* 基因突变,主要突变类型为错义突变或碱基插入/缺失突变。*EYA1* 基因部分外显子重复变异罕见报道,无明确基因型和表型的相关性。本研究通过全外显子测序技术结合临床表型诊断一例鳃-耳-肾综合征患者,该患者 *EYA1* 基因部分外显子(外显子 13~18)重复,扩大了 *EYA1* 基因突变谱,为研究 *EYA1* 基因外显子重复突变导致的鳃-耳-肾综合征提供了一定依据。

参考文献

- [1] Fraser FC, Sproule JR, Halal F. Frequency of the branchio-oto-renal (BOR) syndrome in children with profound hearing loss[J]. *Am J Med Genet*, 1980, 7(3):341-349.
- [2] 孙淑萍, 卢伟, 朱丽雅, 等. 鳃-耳-肾综合征误诊为耳前瘘管二例[J]. *中华耳鼻咽喉头颈外科杂志*, 2014, 49(4):330-332.
- [3] 温莹莹, 孙宇, 孔维佳. 重视基因诊断在鳃耳肾综合征中的应用[J]. *临床耳鼻咽喉头颈外科杂志*, 2018, 32(16):1226-1231.
- [4] Chang EH, Menezes M, Meyer NC, et al. Branchio-oto-renal syndrome: the mutation spectrum in EYA1 and its phenotypic consequences[J]. *Hum Mutat*, 2004, 23(6):582-589.
- [5] Abdelhak S, Kalatzis V, Heilig R, et al. Clustering of mutations responsible for branchio-oto-renal (BOR) syndrome in the eyes absent homologous region (eyaHR) of EYA1[J]. *Hum Mol Genet*, 1997, 6(13):2247-2255.
- [6] Castiglioni A, Melchionda S, Carella M, et al. EYA1-related disorders: Two clinical cases and a literature review[J]. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol*, 2014, 78(8):1201-1210.
- [7] Gigante M, d'Altilia M, Montemurro E, et al. Branchio-Oto-Renal Syndrome (BOR) associated with focal glomerulosclerosis in a patient with a novel EYA1 splice site mutation[J]. *BMC Nephrol*, 2013, 14:60-60.
- [8] Men M, Li W, Chen H, et al. Identification of a Novel CNV at 8q13 in a Family With Branchio-Oto-Renal Syndrome and Epilepsy[J]. *Laryngoscope*, 2020, 130(2):526-532.
- [9] Chen P, Liu H, Lin Y, et al. EYA1 mutations leads to Branchio-Oto syndrome in two Chinese Han deaf families[J]. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol*, 2019, 123:141-145.
- [10] Wang YG, Sun SP, Qiu YL, et al. A novel mutation in EYA1 in a Chinese family with Branchio-oto-renal syndrome[J]. *BMC Med Genet*, 2018, 19(1):139.
- [11] Wang SH, Wu CC, Lu YC, et al. Mutation screening of the EYA1, SIX1, and SIX5 genes in an East Asian cohort with branchio-oto-renal syndrome[J]. *Laryngoscope*, 2012, 122(5):1130-1136.
- [12] 李隽, 王智楠, 黄芳, 等. 0~6岁正常儿童骨导听性脑干反应的特征分析[J]. *听力学及言语疾病杂志*, 2011, 19(2):123-125.
- [13] 刘梦婷, 张天虹. 综合征性耳聋的诊断与治疗略[J]. *临床耳鼻咽喉头颈外科杂志*, 2021, 35(3):285-288.
- [14] Abdelhak S, Kalatzis V, Heilig R, et al. A human homologue of the Drosophila eyes absent gene underlies branchio-oto-renal (BOR) syndrome and identifies a novel gene family[J]. *Nat Genet*, 1997, 15(2):157:164.
- [15] Zou D, Silviu D, Fritsch B, et al. Eya1 and Six1 are essential for early steps of sensory neurogenesis in mammalian cranial placodes[J]. *Development*, 2004, 131(22):5561-5572.
- [16] Ruf RG, Xu PX, Silviu D, et al. SIX1 mutations cause branchio-oto-renal syndrome by disruption of EYA1-SIX1-DNA complexes[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004, 101(21):8090-8095.
- [17] Xu PX, Cheng J, Epstein JA, et al. Mouse Eya genes are expressed during limb tendon development and encode a transcriptional activation function[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1997, 94(22):11974-11979.
- [18] Li X, Oghi KA, Zhang J, et al. Eya protein phosphatase activity regulates Six1-Dach-Eya transcriptional effects in mammalian organogenesis [J]. *Nature*, 2003, 426(6964):247-254.
- [19] Buller C, Xu X, Marquis V, et al. Molecular effects of Eya1 domain mutations causing organ defects in BOR syndrome[J]. *Hum Mol Genet*, 2001, 10(24):2775-2781.
- [20] Musharraf A, Kruspe D, Tomasch J, et al. BOR-syndrome-associated Eya1 mutations lead to enhanced proteasomal degradation of Eya1 protein[J]. *PLoS One*, 2014, 9(1):e87407.
- [21] Brophy PD, Alasti F, Darbro BW, et al. Genome-wide copy number variation analysis of a Branchio-oto-renal syndrome cohort identifies a recombination hotspot and implicates new candidate genes[J]. *Hum Genet*, 2013, 132(12):1339-1350.
- [22] Dantas VG, Freitas EL, Della-Rosa VA, et al. Novel partial duplication of EYA1 causes branchiootic syndrome in a large Brazilian family[J]. *Int J Audiol*, 2015, 54(9):593-598.

(收稿日期:2021-02-03;修回日期:2021-03-30)