

基于显微鉴别和可视化探针技术的砂仁鉴别研究

郭利霄, 齐兰婷, 申亚君, 刘钊, 郑玉光*, 侯芳洁* (河北中医学院, 河北省中药炮制技术创新中心, 石家庄 050000)

摘要: 目的 应用显微鉴别和基于 *ITS2* 序列差异的可视化探针杂交技术鉴别阳春砂、疣果砂仁、海南假砂仁。方法 采用徒手切片法对砂仁及其混淆品的种子进行制片并观察其显微结构。然后提取阳春砂、疣果砂仁、海南假砂仁的总基因组 DNA, PCR 扩增其 *ITS2* 序列, 回收 PCR 产物并连接 T 载体, 筛选阳性质粒并测序, 根据测序所得 *ITS2* 序列设计阳春砂的专属荧光探针, 并取探针 1 ng 与砂仁及其混淆品的 *ITS2* PCR 扩增产物进行液相杂交。反应条件: 95 °C 变性 5 min, 70 °C 退火 30 s, 在 489 nm 荧光下进行激发检测。结果 阳春砂与其混淆品的显微结构区别主要在于色素层的层数和外胚乳细胞的形状。所设计的专属探针仅与阳春砂 *ITS2* PCR 产物特异性结合, 而不与其混淆品结合。亦可以通过荧光的强弱来定量鉴别中成药中砂仁的掺伪现象。结论 通过显微鉴别和基于 *ITS2* 序列差异的可视化探针杂交技术能够很好地鉴别砂仁的真伪, 且不要求中药的具体形式, 方法简便快捷、成本低、技术门槛低, 开拓了更加便捷、准确的砂仁药材的鉴别方法。

关键词: 阳春砂; 显微鉴别; *ITS2*; 可视化杂交

中图分类号: R284.1

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2021)03-0294-05

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2021.03.007

引用本文: 郭利霄, 齐兰婷, 申亚君, 等. 基于显微鉴别和可视化探针技术的砂仁鉴别研究[J]. 中国现代应用药学, 2021, 38(3): 294-298.

Identification of *Amomum Villosum* Lour. Based on Microscopic Identification and Visual Probe Technology

GUO Lixiao, QI Lanting, SHEN Yajun, LIU Zhao, ZHENG Yuguang*, HOU Fangjie* (Hebei University of Chinese Medicine, Traditional Chinese Medicine Processing Technology Innovation Center of Hebei Province, Shijiazhuang 050000, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To identify *Amomum villosum* Lour., *A. muricarpum* Elm., and *A. chinense* Chun ex T. L. Wu by microscopical identification and visual probe hybridization technology based on *ITS2* sequence difference. **METHODS** The seeds of *A. villosum* and its adulterants were sliced with bare hands, and the temporary chips were made to observe its microstructure. The total genomic DNA of *A. villosum* Lour., *A. muricarpum* Elm. and *A. chinense* Chun ex T. L. Wu were extracted, the *ITS2* sequence was amplified by PCR, the PCR product was recovered and T vector was connected, the positive plasmid was screened and sequenced, the specific fluorescent probe of *A. villosum* Lour. was designed according to the *ITS2* sequence, and 1 ng probe was hybridized with the *ITS2* PCR product of *A. villosum* Lour. and its adulterants. The reaction conditions: denaturation at 95 °C for 5 min, annealing at 70 °C for 30 s, excitation detection was performed at 489 nm. **RESULTS** The difference of microstructure between *A. villosum* Lour. and its adulterants lied in the number of pigment layers and the shape of endosperm cells. The special designed probe of *A. villosum* Lour. was specifically combined with *ITS2* PCR products, but not with *ITS2* PCR products of *A. muricarpum* Elm. and *A. chinense* Chun ex T. L. Wu. The adulteration of *A. villosum* Lour. in traditional Chinese medicine could also be quantitatively identified by the intensity of fluorescence. **CONCLUSION** Microscopical identification and visual probe hybridization technology based on *ITS2* sequence difference can identify the true and false of *A. villosum* Lour., and do not require the specific form of traditional Chinese medicine, and the method is simple, fast identification, low cost, and low technical threshold, which opens up a more convenient and accurate identification method of *A. villosum* Lour..

KEYWORDS: *Amomum villosum* Lour.; microscopic identification; *ITS2*; visual hybridization

砂仁是常用的一味中药材, 食用和药用已经有 1 300 多年的历史。砂仁药材来源于姜科植物阳春砂 *Amomum villosum* Lour.、绿壳砂 *Amomum villosum* Lour.var.*xanthioides* T.L.Wu et Senjen 或

海南砂 *Amomum longiligulare* T.L.Wu 的干燥成熟果实, 具有化湿开胃、温脾止泻、理气安胎的功效^[1]。目前砂仁主产于广东省阳春市、广西、云南等地, 主要含油乙酸龙脑酯、龙脑等挥发性成分

基金项目: 孙宝惠全国名老中医药专家传承工作室(7002016008005); 河北中医学院大学生创新创业训练计划项目(201914432073); 河北省中医药管理局科研计划项目(2019079)

作者简介: 郭利霄, 女, 硕士 Tel: 15633859849 E-mail: 15633859849@163.com *通信作者: 侯芳洁, 女, 硕士, 副教授 Tel: 15130687505 E-mail: 15130687505@163.com 郑玉光, 男, 硕士, 教授 Tel: 13931856959 E-mail: zyg314@163.com

以及黄酮类等非挥发性成分^[2-8]。砂仁具有保护胃肠^[9-10]、降血糖^[11-12]、镇痛止泻^[13-14]、抑菌^[15-17]、清除自由基活性^[18]等临床作用。受环境变迁的影响,授粉昆虫的数目不断减少,进而导致阳春砂的种植面积大大萎缩,产量大幅度降低^[2,19-20]。市场上品种混杂、伪品广布的现象较为严重,全国各地出售以及地方习用品就有 37 种,包括豆蔻属(*Amomum*)和山姜属(*Alpinia*)等砂仁近似种属的植物,且大多外观和气味等相似,不容易区分^[21-23]。经市场调查发现亦有数种进口砂仁充当正品砂仁进行出售,特别是去壳砂仁已经失去果皮的鉴别特征,单单从传统的性状鉴别其真伪较为困难。本研究主要应用显微鉴别和可视化分子探针技术相结合的方法来鉴别砂仁及其混淆品,为去壳砂仁和含有砂仁药材的中成药鉴别提供依据。

1 材料

1.1 药材

砂仁及其混淆品样品均购自河北安国中药材市场,具体信息见表 1。经过河北中医学院药学院郑玉光教授鉴定其分别为阳春砂仁、疣果砂仁、海南假砂仁。

表 1 砂仁及其混淆品收集信息表

Tab. 1 Collection information of *Amomum villosum* Lour. and its adulterants

序号	产地	样品份数	品种	收集时间
1	中国云南	5	阳春砂仁	2018-05-10
2	中国广东	5	疣果砂仁	2018-05-10
3	越南	5	海南假砂仁	2018-05-10

1.2 仪器

Nikon Digital sight DS-Fi2、Nikon Digital sight DS-U3 显微镜(日本 Nikon); Applied Biosystems® Veriti PCR 仪[赛默飞世尔科技(中国)有限公司]; Eppendorf 5804R 多功能台式离心机、Innova®S44i 恒温摇床(艾德本中国); DYY-6D 电泳仪(北京六一生物科技有限公司); ChemiDoc XRS+凝胶成像系统(美国 Bio-Rad 公司)。

1.3 试剂

溴化十六烷基三甲铵(CTAB)提取液($1.4 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl, $100 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Tris pH 8.0, $20 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ EDTA pH 8.0, 2% PVP, 2% CTAB, 3% β -巯基乙醇); TransStart FastPfu DNA Polymerase(批号: AP231-13)、Trans1-T1 Phage Resistant Chemically Competent Cell(批号: CD501-02)、pEASY-Blunt Cloning Kit(批号:

CB101-01)均购自北京全式金生物技术有限公司; 凝胶 DNA 小量回收试剂盒(批号: D2110-03)、高纯质粒 DNA 微量提取试剂盒(批号: P1002-03)均购自 Magen 生物; 氯仿(天津市风船化学试剂科技公司); 水合氯醛溶液、稀甘油溶液、70%乙醇、异丙醇(天津市永大化学试剂有限公司)。

2 方法

2.1 显微鉴别^[24]

取阳春砂、疣果砂仁、海南假砂仁去除外果皮,取种子,进行徒手切片。用毛笔从中挑取最薄的切片置于载玻片上,滴加水合氯醛、稀甘油溶液,盖上盖玻片制成临时装片。将制好的装片置于显微镜下,观察其种皮表皮细胞、下皮细胞、油细胞、色素层、内种皮细胞、外胚乳细胞。

2.2 基于 ITS2 的可视化荧光探针鉴别

2.2.1 DNA 提取 采用 CTAB^[25]法提取阳春砂、疣果砂仁、海南假砂仁的 DNA,测其原序列。用 Pfu 酶进行扩增,并构建到 T 载体上。扩增引物为 ITS2-F 和 ITS2-R(北京全式金生物技术有限公司)见表 2。

表 2 引物

Tab. 2 Primer

引物	序列
正向引物	ITS2-F: 5'-ATGCGATACTTG-GTGTGAAT-3'
反向引物	ITS2-R: 5'-GACGCT-TCTCCAGACTACAAT-3'

2.2.2 序列扩增测序 PCR 反应体系($20 \mu\text{L}$): $10 \mu\text{L}$ Taq mix、 $0.5 \mu\text{L}$ ITS2-F、 $0.5 \mu\text{L}$ ITS2-R、 $9 \mu\text{L}$ ddH₂O。扩增程序为 95°C 5 min, 95°C 30 s, 54°C 30 s, 72°C 30 s, 回至步骤 2 重复循环 34 次, 72°C 5 min, 16°C 保存。

2.2.3 阳性克隆检测 在超净台中挑选白色单克隆于 PCR 反应体系中,PCR 反应体系($20 \mu\text{L}$): $10 \mu\text{L}$ Taq mix、 $0.5 \mu\text{L}$ ITS2-F、 $0.5 \mu\text{L}$ ITS2-R、 $9 \mu\text{L}$ ddH₂O。按照 ITS2 序列扩增反应条件扩增。PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测后,挑选条带分子量正确的克隆,将其接种于 LB/Kan⁺ 的液体培养基中, $200 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 、 37°C 过夜培养。用高纯质粒 DNA 微量提取试剂盒提取阳春砂、疣果砂仁、海南假砂仁质粒,质粒由华大基因科技股份有限公司测序,各样品均为双向测通。将得到的 ITS2 序列使用 Sequencher 软件进行人工比对拼接。

2.2.4 设计专属荧光探针 运用 Premier Primer 5.0 软件对阳春砂、疣果砂仁、海南假砂仁 ITS2

序列进行比对,找到具有稳定差异的特异性位点,并根据特异性片段合成专一的荧光探针,由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

2.2.5 探索液相杂交条件 将阳春砂、疣果砂仁、海南假砂仁质粒稀释后作为模板,扩增得到 *ITS2* PCR 扩增产物,用于后续液相杂交操作。调平三者上样量,优化液相杂交条件。

3 结果

3.1 显微鉴别

阳春砂、疣果砂仁、海南假砂仁显微结构由外至内依次为假种皮(一般脱落)、种皮表皮细胞、下皮细胞、油细胞层、色素层细胞、内种皮细胞、外胚乳细胞。

3.1.1 阳春砂 *Amomum villosum* Lour. 的种子横切面显微图 种皮表皮细胞 1 列,呈径向延长,细胞壁稍厚。下皮细胞 1 列内含棕色或红棕色物质,细胞界限不明显。油细胞 1 列,呈长方形,细胞比较规则,内含有黄色油滴。色素层由约 4 层棕色的不规则细胞组成。内种皮为 1 列深棕色的栅状厚壁细胞,内含有硅质块。外胚乳呈类长方形或者不规则形,细胞壁呈大波状弯曲,内充满淀粉团,偶有细小的草酸钙晶体,见图 1。

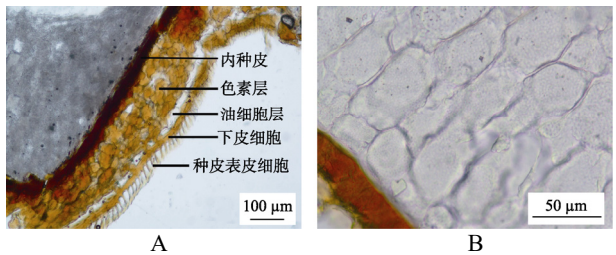


图 1 阳春砂的种子的横切面构造图
A—横切面; B—外胚乳。

Fig. 1 Cross sectional structure of *A. villosum* Lour. seeds
A—transverse section; B—perisperm.

3.1.2 疣果砂仁 *A. muricarpum* Elm. 的种子横切面显微图 种皮表皮细胞 1 列,呈径向延长,细胞壁稍厚。下皮细胞 1 列内含深棕色物质,细胞界限不明显。油细胞 1 列,呈长方形,细胞比较规则,内含有油滴。色素层由约 3 层的浅棕色细胞组成,细胞皱缩界限模糊。内种皮为 1 列深棕色的栅状厚壁细胞,内含有硅质块。外胚乳呈多角形,细胞壁不弯曲,内充满淀粉团,无明显的晶体存在,见图 2。

3.1.3 海南假砂仁 *A. chinense* Chun ex T. L. Wu 的种子横切面显微图 种皮表皮细胞 1 列,呈径向延长,细胞壁稍厚。下皮细胞 1 列,内含有浅棕

色的物质。油细胞 1 列,呈长方形,细胞比较规则,内含有油滴。色素层由多层细胞组成,细胞壁较厚,内含有黄棕色的色素,细胞皱缩不规则,界限不明显。内种皮细胞为 1 列栅状厚壁细胞,为棕色,内含有硅质块。外胚乳呈长条形,壁呈波状弯曲,内充满淀粉粒团,胚乳中偶有晶体存在,见图 3。

综上所述,砂仁及其混淆品显微结构区别见表 3。

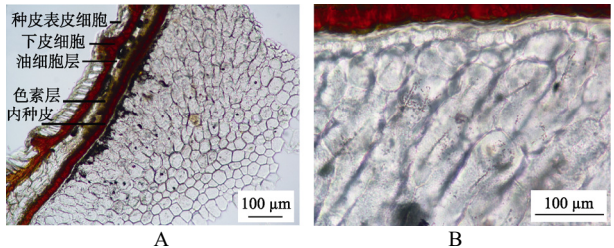


图 2 疣果砂仁的种子的横切面构造图
A—横切面; B—外胚乳。

Fig. 2 Cross sectional structure of *A. muricarpum* Elm. seeds
A—transverse section; B—perisperm.

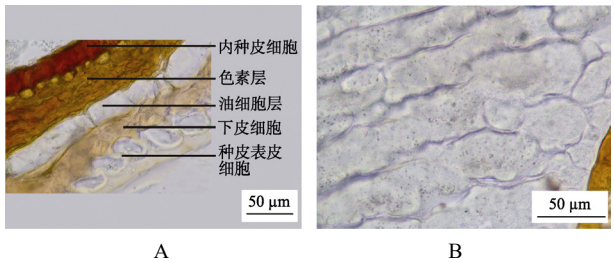


图 3 海南假砂仁的种子的横切面构造图
A—横切面; B—外胚乳。

Fig. 3 Cross sectional structure of *A. chinense* Chun ex T. L. Wu seeds
A—transverse section; B—perisperm.

表 3 阳春砂及其混淆品显微结构对比

Tab. 3 Microstructure comparison of *A. villosum* Lour. and its adulterants

显微结构	阳春砂	疣果砂仁	海南假砂仁
色素层	约 4 层	约 3 层	多层
外胚乳 形态	长方形或不规则形	不规则长多角形	长条形
细胞壁	大波浪状弯曲	不弯曲	波浪状弯曲
晶体	偶有细小晶体	无明显晶体	偶有晶体

3.2 阳春砂、疣果砂仁、海南假砂仁 *ITS2* 的可视化探针技术鉴别结果

3.2.1 基于 *ITS2* 序列的可视化探针比对 提取阳春砂、疣果砂仁、海南假砂仁的基因组 DNA,利用 *ITS2* 引物扩增并获得阳春砂、疣果砂仁、海南假砂仁 *ITS2* 基因的 PCR 产物见图 4。阳春砂、疣



图4 阳春砂、海南假砂仁、疣果砂仁的 *ITS2* 序列对比图

Fig. 4 Comparison of *ITS2* sequences of *A. villosum* Lour., *A. chinense* Chun ex T. L. Wu and *A. muricarpum* Elm.

果砂仁、海南假砂仁的 *ITS2* 序列长度均为 497 bp，三者的序列相似性为 99.53%，仅有少数 SNP 位点存在变异。单独比对正品阳春砂 *ITS2* 序列与其余 2 个伪品的 *ITS2* 序列，阳春砂与疣果砂仁的 *ITS2* 序列中共有 3 个 SNP 位点，二者相似度为 99.4%，阳春砂与海南假砂仁的 *ITS2* 序列中共有 6 个 SNP 位点，相似度为 98.79%。

3.2.2 探针的设计与检测 选取阳春砂、疣果砂仁、海南假砂仁 *ITS2* 序列差异最多的区域设计探针。在 183~233 bp 处，阳春砂与疣果砂仁间具有 2 个 SNP 位点，阳春砂与海南假砂仁间具有 3 个 SNP 位点。利用探针与模板结合能力的强弱以区分阳春砂与 2 个伪品。在设计过程中为提升探针结合的特异性，本研究引入了 2 个碱基的突变，将 221 位的 G 突变为 T，226 位的 C 突变为 A 以降低探针与模板结合的温度。并在其 5' 端引入 Cy2 荧光标记，用以检测探针与 PCR 产物的结合。待循环完毕后，加入探针，设置杂交反应条件，进行液相杂交。杂交完毕后琼脂糖凝胶电泳分离目的片段，荧光检测。由图 5 可知，在杂交退火温度为 70 °C 时，探针与模板的结合能力存在差异。在此温度，有且仅有阳春砂的 PCR 产物可以与荧光探针结合，而其伪品不能与探针结合。其余各温度探针均不能结合三者的 PCR 产物。基于阳春砂序列设计的探针在此杂交条件下可有效结合阳春砂 *ITS2* 序列，条带单一、明亮、锐利，且完全不与疣果砂仁、海南假砂仁等伪品的 *ITS2* 序列相结合，具有较高的鉴定特异性。



图5 可视化探针杂交

1-阳春砂；2-疣果砂仁；3-海南假砂仁。

Fig. 5 Visual probe hybridization

1-*A. villosum* Lour.; 2-*A. muricarpum* Elm.; 3-*A. chinense* Chun ex T. L. Wu.

4 讨论

通过观察砂仁及其混淆品的显微结构，其色素层细胞的层数、颜色和外胚乳的形态存在显著差异。徒手切片耗费的试剂和所需的时间较少，大大缩短了鉴别的成本和时间，方便、快捷。通过显微鉴别可以对砂仁的药材及饮片以及去壳砂仁(砂仁米)进行鉴别，但是对于砂仁的粉末鉴别较为困难，特别是含有砂仁原粉的中成药无法使用该方法进行鉴别。而可视化探针杂交技术鉴别是加入设计好的探针，通过检测杂交条带是否存在以判断真伪，进行定性鉴别，也通过 PCR 的手段调整 DNA 和探针的上样量，并结合 DNA 凝胶电泳图条带的灰度值进行定量分析，以探针所携带的荧光发射光的强弱予以区分，与探针结合得强则条带释放的荧光强度高、条带亮度高，为正品；结合得弱则条带弱，有可能掺有伪品；伪品则不能与探针结合，不显荧光。该方法弥补了显微鉴别的不足，运用显微鉴别和可视化探针杂交技术相结合的方法来控制砂仁的品质，保证临床用药安全，为人民的健康用药提供保障。

本研究采用可视化探针杂交技术仅对正品阳春砂、混淆品疣果砂仁、海南假砂仁进行了鉴别,样品量有限。今后可以通过更多的样品去验证该方法的可行性和普遍适用性。基于 *ITS2* 序列的可视化探针杂交技术采用国际公认的序列,不用进行序列查找,结果观察简单明了、成本低、操作简便、准确性高、易于普及,同时为形态特征高度形似的中药材鉴别提供了有效手段。

REFERENCES

- [1] 中国药典. 一部[S]. 2015: 253.
- [2] 米文娟. 基于水煎液胃肠道代谢吸收的砂仁质量评价研究[D]. 北京: 北京中医药大学, 2018.
- [3] ZENG Z, XI Z C, MENG S J, et al. Study on volatile constitutions and quality evaluation of different varieties of Fructus Amomum[J]. J Instrum Anal(分析测试学报), 2010, 29(7): 701-706.
- [4] CHEN C. Study on the chemical constituents and fingerprint of *Amomum villosum* Lour[D]. Guangzhou: Jinan University(暨南大学), 2012.
- [5] ZHANG S T, WANG Z Y, WANG T S, et al. Composition and antimicrobial activities of essential oil of Fructus Amomi[J]. Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发), 2011, 23(3): 464-472.
- [6] FU C, CHEN C, ZHOU G X, et al. Chemical constituents from fruits of *Amomum villosum*[J]. Chin Tradit Herb Drugs(中草药), 2011, 42(12): 2410-2412.
- [7] FAN Y M, HUANG X L, CHENG Y X, et al. Purification and analysis of the *Amomum villosum* Lour polysaccharides[J]. J Guangzhou Univ(Nat Sci Ed)(广州大学学报), 2006, 5(4): 30-32.
- [8] LI S J, ZHANG D Y, YAN Y J, et al. Optimization of ultrasound-assisted extraction technology of polysaccharides from *Amomum villosum* by response surface methodology[J]. Chin J Exp Tradit Med Form(中国实验方剂学杂志), 2013, 19(22): 47-51.
- [9] ZHANG T, LU S H, YANG X X, et al. Protective effect of Amomi Fructus water extraction on intestinal mucositis induced by 5-FU[J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2019, 36(3): 286-291.
- [10] JAFRI M A, FARAH, JAVED K, et al. Evaluation of the gastric antiulcerogenic effect of large cardamom (fruits of *Amomum subulatum* Roxb)[J]. J Ethnopharmacol, 2001, 75(2/3): 89-94.
- [11] ZHAO R J, ZHAO Z L, JIN M H, et al. Hypoglycemic effects of extract of *Amomum xanthoides* on experimental diabetes in rats[J]. J Med Sci Yanbian Univ(延边大学医学学报), 2006, 29(2): 97-99.
- [12] KWON K B, KIM J H, LEE Y R, et al. *Amomum xanthoides* extract prevents cytokine-induced cell death of RINm5F cells through the inhibition of nitric oxide formation[J]. Life Sci, 2003, 73(2): 181-191.
- [13] WU X S, XIAO F, ZHANG Z D, et al. Research on the analgesic effect and mechanism of bornyl acetate in volatile oil from *Amomum villosum*[J]. J Chin Med Mater(中药材), 2005, 28(6): 505-507.
- [14] LI X G, YE F Q, XU H H. Study on pharmacological effects of bornyl acetate in volatile oil of *Amomum villosum*[J]. West China J Pharm Sci(华西药学杂志), 2001, 16(5): 356-358.
- [15] MATHEW J, SHIBURAJ S, GEORGE V. Antimicrobial activity of *Amomum cannicarpum*[J]. Fitoterapia, 2003, 74(5): 476-478.
- [16] TANG J Y, LIU F J, SU M X, et al. Study on antioxidant and antimicrobial effects of extract from *Amomum villosum*[J]. J Xiamen Univ(Nat Sci)(厦门大学学报: 自然科学版), 2012, 51(4): 789-792.
- [17] ZHANG S T, WANG Z Y, WANG T S, et al. Composition and antimicrobial activities of essential oil of Fructus Amomi[J]. Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发), 2011, 23(3): 464-472.
- [18] ZHANG D Y, LI S J, XIONG Q P, et al. Extraction, characterization and biological activities of polysaccharides from *Amomum villosum*[J]. Carbohydr Polym, 2013, 95(1): 114-122.
- [19] CHEN J, DING P, XU X C, et al. A resource investigation and commodity identification of Fructus Amomi[J]. J Chin Med Mater(中药材), 2001, 24(1): 18-19.
- [20] YAN W L, HUANG Z S. The study of the absorption of curcumin in Caco-2 cell model and in rats of single-pass intestinal perfusion[D]. Guangzhou: Guangzhou University of Chinese Medicine(广州中医药大学), 2012.
- [21] 叶邦梅. 砂仁等6种姜科常用中药的性状鉴别[J]. 时珍国医国药, 2007, 18(4): 925.
- [22] CENG Y J, CHEN X, PENG H R. *Amomum villosum* Lour and other familiar mixtures classification and identification[J]. Guizhou Sci(贵州科学), 2005(3): 60-64.
- [23] HOU F J, GUO L X, SONG J N, et al. Identification of Amomi Fructus and its adulterate products by the characteristic and micro-morphology in Hebei Anguo market[J]. J Nanjing Univ Tradit Chin Med(南京中医药大学学报), 2019, 35(2): 214-217.
- [24] LIU M, CHEN G Y, XIE L Y, et al. Identification of the medicine of *Melastoma dodecandrum* Lour. and its adulterants[J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2019, 36(22): 2818-2822.
- [25] WANG Y, CHENG J L. Extraction of total DNA from *Populus euphratica* Oliv. and *Populus pruinosa* Schrenk by improved CTAB method[J]. Chin Med Mod Dis Edu China(中国中医药现代远程教育), 2018, 16(22): 89-91, 130.

收稿日期: 2019-11-28

(本文责编: 李艳芳)