

• 论 著 •

甲状腺乳头状癌石蜡标本 BRAF V600E 基因突变检测方法的比较研究^{*}易清清¹, 梁冬雨¹, 史俊峰², 沙 爽², 杨 荣³, 常 庆^{1△}

(1. 上海健康医学院附属嘉定区中心医院中心实验室, 上海 201800; 2. 上海健康医学院分子影像中心, 上海 201318; 3. 上海健康医学院附属嘉定区中心医院病理科, 上海 201800)

摘要:目的 分析、比较聚合酶链反应(PCR)-荧光探针法、微滴式数字聚合酶链反应(ddPCR)法、MassARRAY 核酸质谱法和 Sanger 测序法检测甲状腺乳头状癌患者石蜡标本中 BRAF V600E 基因突变阳性率。方法 收集 35 例 2013 年手术切除的甲状腺乳头状癌石蜡标本(已知新鲜组织用 PCR-荧光探针法检测 BRAF V600E 基因突变全阳性), 分别采用 PCR-荧光探针法、ddPCR 法、MassARRAY 核酸质谱法和 Sanger 测序法检测甲状腺乳头状癌石蜡标本中 BRAF V600E 基因突变情况。结果 35 例甲状腺乳头状癌石蜡标本 PCR-荧光探针法、ddPCR 法、MassARRAY 核酸质谱法和 Sanger 测序法检测 BRAF V600E 基因突变阳性率分别为 80.0%(28/35)、94.3%(33/35)、74.3%(26/35) 和 60.0%(21/35)。结论 对于需要进行回顾性分析的甲状腺乳头状癌石蜡标本, ddPCR 法更适用于 BRAF V600E 基因突变的检测。

关键词:BRAF V600E 基因突变; 聚合酶链反应-荧光探针; 微滴式数字聚合酶链反应; MassARRAY 核酸质谱; Sanger 测序

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2020.14.003**中图法分类号:**R736.1**文章编号:**1673-4130(2020)14-1674-05**文献标识码:**A**Comparative study of BRAF V600E gene mutation detection methods****in paraffin specimens of thyroid papillary carcinoma^{*}**YI Qingqing¹, LIANG Dongyu¹, SHI Junfeng², SHA Shuang², YANG Rong³, CHANG Qing^{1△}

(1. Clinical Research Center, Affiliated Jiading District Central Hospital, Shanghai University of Medicine and Health Sciences, Shanghai 201800, China; 2. Molecular Imaging Center, Shanghai University of Medicine and Health Sciences, Shanghai 201318, China;

3. Department of Pathology, Affiliated Jiading District Central Hospital, Shanghai University of Medicine and Health Sciences, Shanghai 201800, China)

Abstract: Objective To analyze and compare the positive rates of BRAF V600E gene mutation in paraffin specimens of the patients with thyroid papillary carcinoma detected by PCR-fluorescent probe method, droplet digital PCR (ddPCR) method, MassARRAY nucleic acid mass spectrometry method and Sanger sequencing method. **Methods** Thirty-five paraffin specimens from the patients with thyroid papillary carcinoma by surgical resection in 2013 (known BRAF V600E gene mutation positive for all fresh tissues detected by PCR-fluorescent probe method) were collected. The BRAF V600E gene mutation was detected by the PCR-fluorescent probe method, ddPCR method, MassARRAY nucleic acid mass spectrometry method and Sanger sequencing method. **Results** The positive rates of BRAF V600E gene mutation detected by PCR-fluorescent probe method, ddPCR method, MassARRAY mass spectrometry method and Sanger sequencing method were 80.0% (28/35), 94.3% (33/35), 74.3% (26/35) and 60.0% (21/35) respectively. **Conclusion** For the paraffin specimens of thyroid papillary carcinoma needing to conduct the retrospective analysis, the ddPCR method is more suitable for the BRAF V600E gene mutation detection.

Key words:BRAF V600E 基因突变; PCR-荧光探针; 微滴式数字聚合酶链反应; MassARRAY 核酸质谱; Sanger 测序

^{*} 基金项目:上海市嘉定区农业和社会事业科研项目(JDKW-2018-W21)。

作者简介:易清清,女,技师,主要从事临床病理学技术研究。 △ 通信作者,E-mail:robie0510@hotmail.com。

本文引用格式:易清清,梁冬雨,史俊峰,等.甲状腺乳头状癌石蜡标本 BRAF V600E 基因突变检测方法的比较研究[J].国际检验医学杂志,2020,41(14):1674-1677.

甲状腺癌是人类常见的内分泌系统恶性肿瘤,近年来世界范围内其发病率上升趋势明显^[1]。在我国,甲状腺癌的发病率同样处于上升趋势,部分地区近十年增长了近 10 倍,是目前发病率上升最快的实体恶性肿瘤之一^[2]。甲状腺癌的病理分型包括甲状腺乳头状癌(PTC)、甲状腺滤泡状腺癌(FTC)、甲状腺未分化癌(ATC)及甲状腺髓样癌(MTC)。PTC 和 FTC 属于分化的甲状腺癌,占全部甲状腺癌的 90%。BRAF 基因位于 7q34,其最常见的突变位点为第 15 号外显子的密码子 600,在胸腺嘧啶转化为腺苷酸过程中,该突变基因在氨基酸水平上由缬氨酸取代谷氨酸,该位点突变被定义为 BRAF V600E^[3-5]。BRAF 存在 30 个以上不同的基因突变,但 V600E 约占 90%。研究发现,BRAF V600E 基因突变是 PTC 最常见的基因突变,突变阳性率为 29%~83%,平均为 45%,与经典型 PTC(乳头结构和核型改变,核分裂象罕见,沙砾样钙化常见)的预后差直接相关^[6-7]。因此,该突变可作为诊断和判断预后的分子生物学标志及治疗 PTC 的靶基因。BRAF V600E 基因突变与甲状腺癌的关系已成为目前研究的热点^[8-9]。

目前 BRAF V600E 基因突变检测的方法有很多,且各有优缺点。本文采用聚合酶链反应(PCR)-荧光探针法、微滴式数字聚合酶链反应(ddPCR)法、MassARRAY 核酸质谱法和 Sanger 测序法,分析 2013 年收集的 35 例 PTC 患者石蜡标本(已知新鲜组织 2013 年用 PCR-荧光探针法检测 BRAF V600E 基因突变全阳性)BRAF V600E 基因突变检测结果,为医院针对既往保存的石蜡标本中 BRAF V600E 基因突变选择合适的检测方法提供参考和依据。

1 资料与方法

1.1 标本来源 35 例 PTC 石蜡包埋组织标本取自上海健康医学院附属嘉定区中心医院病理科,患者于 2013 年在该院确诊并手术取出 PTC 组织后包埋成蜡块存档。35 例 PTC 患者的新鲜组织于 2013 年进行 PCR-荧光探针法检测 BRAF V600E 基因突变,突变阳性率为 100%(35/35)。35 例标本依次编号为 1~35,所有标本均经 10% 甲醛溶液固定,常规石蜡包埋,组织切片后经病理医师复阅切片明确诊断,并评估肿瘤细胞含量。

1.2 方法

1.2.1 DNA 提取 常规消毒所用物品,20 μm 连续切片 4~6 张,参照 35 例 PTC 石蜡包埋组织标本的 HE 染色切片,分别选择肿瘤细胞丰富的区域进行刮取,尽量避开非肿瘤区、坏死区。使用 QIAGEN DNA FFPE Tissue Kit,按照说明书步骤提取基因组 DNA,经 Thermo Fisher® NanoDrop2000 超微量分光光度计测定 DNA 纯度及水平,其中 A_{260}/A_{280} 要求在 1.8~2.1。

1.2.2 PCR-荧光探针法 使用武汉友芝友公司生产的人类 BRAF V600E 基因突变检测试剂盒,于 Roche® LightCycler480 实时荧光定量 PCR 仪上检测 BRAF V600E 的突变情况,具体操作步骤按试剂盒说明书进行。最后根据扩增曲线划定合适的荧光阈值,得到组织标本的 Ct 值并计算相关 ΔCt 值。突变检测 Ct 值 ≥38 或无 Ct 值,则该标本为突变阴性;突变检测 Ct 值 <38,ΔCt 值 <9,则该标本为突变阳性;突变检测 Ct 值 <38,ΔCt 值 ≥9,则该标本为突变阴性。

1.2.3 ddPCR 法 使用 PrimePCR™ ddPCR™ BRAF V600E 突变检测试剂盒于 QX® 200 Bio-Rad 微滴式数字 PCR 仪上检测 PTC 石蜡标本 BRAF V600E 基因突变情况,具体操作步骤按试剂盒说明书进行。最后由 Quanta Soft 完成对数据的自动处理,获得靶序列在 PCR 反应体系中的拷贝数水平(单位:copy/μL),通过野生型拷贝数和突变型拷贝数计算突变比例。突变比例 >0 为突变阳性。

1.2.4 MassARRAY 核酸质谱法 整个检测过程分为两个阶段进行。首先设计 PCR 扩增引物,V600E-F:5'-ACG TTG GAT GTT CAA ACT GAT GGG ACC CAC-3';V600E-R:5'-ACG TTG GAT GTC TTC ATG AAG ACC TCA CAG-3',富集含 BRAF 基因 15 号外显子的 PCR 片段。然后针对突变位点设计特异的探针引物,Unextension primer(UEP):5'-GAT TTT GGT CTA GCT ACA G-3',于 Agena® MALDI-TOF MassARRAY 质谱仪上通过单碱基延伸试验获得突变/野生型位点基因片段混合产物,最后通过质谱分离这些差异片段,实现 BRAF V600E 基因突变检测。质谱图中有突变峰为突变阳性。

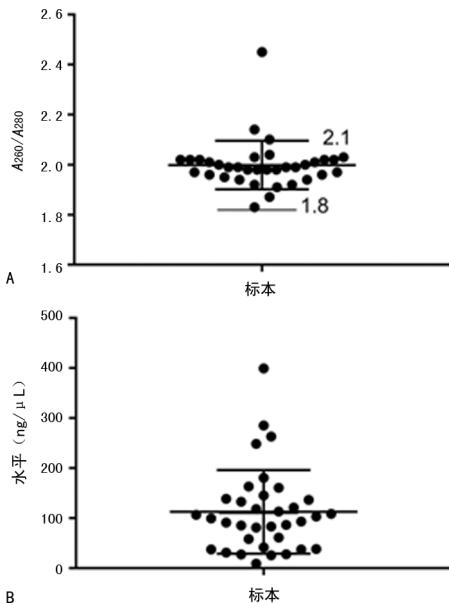
1.2.5 Sanger 测序法 使用下列引物扩增 BRAF 基因第 15 号外显子。V600P5:5'-AGC ATC TCA CCT CAT CCT AAC ACA-3';V600P3:5'-CTA GTA ACT CAG CAG CAT CTC AGG-3'。PCR 反应体系为 30.0 μL: 模板 DNA 2.0 μL, 引物 P5/P3 (10 μmol/L) 各 0.5 μL, 双蒸水 27.0 μL。PCR 反应条件:95 °C 预变性 3 min, 94 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 30 s, 30 个循环, 最后 72 °C 延伸 10 min。利用核酸外切酶和热敏磷酸酶纯化 PCR 产物,将纯化的 PCR 产物进行测序反应,测序产物经纯化后在 ABI 3500XL 基因分析仪上进行基因测序。

1.3 统计学处理 使用 GraphPad Prism v5.0 软件和 SPSS20.0 软件进行统计处理和分析,计数资料以率或例数表示,组间比较采用 χ^2 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 石蜡标本提取 DNA 的纯度与水平检测结果 35 例 PTC 石蜡标本提取基因组 DNA,其纯度和

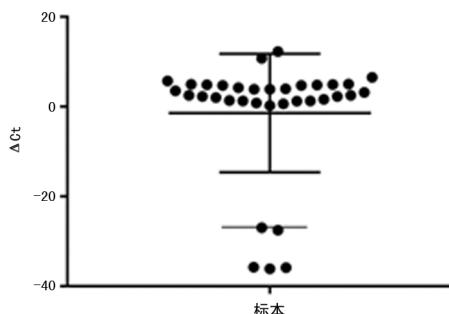
水平检测结果见图 1。其中标本 7、8 的 A_{260}/A_{280} 分别为 2.45 和 2.14, 纯度不符合要求。其余标本的 A_{260}/A_{280} 为 1.8~2.1, 水平均大于 10 ng/ μ L, 符合后续试验要求。



注:A 为提取的基因组 DNA 纯度, $n=35$;B 为提取的基因组 DNA 水平, $n=35$ 。

图 1 石蜡标本提取的基因组 DNA 的纯度与水平

2.2 PCR-荧光探针法检测结果 35 例 PTC 石蜡标本中, PCR-荧光探针法检测 BRAF V600E 基因突变阳性率为 80.0% (28/35)。其中标本 7、20、23、24、30 无扩增曲线, 没有 Ct 值, 检测突变结果为阴性; 标本 6、8 的 Ct 值 <38 , $\Delta Ct \geq 9$, 检测突变结果为阴性; 其余标本的 Ct 值 <38 , $\Delta Ct < 9$, 检测突变结果为阳性。见图 2。



注: 结果为根据扩增曲线和荧光阈值计算得到的各标本 ΔCt 值。

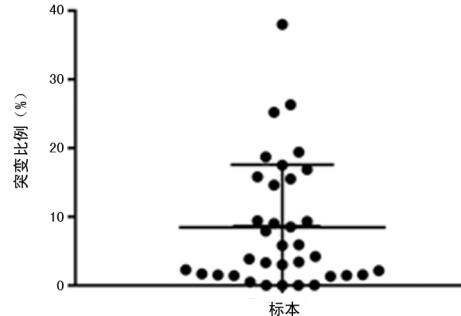
图 2 PCR-荧光探针法检测 BRAF V600E 基因突变结果

2.3 ddPCR 法检测结果 35 例 PTC 石蜡标本中, ddPCR 法检测 BRAF V600E 基因突变阳性率为 94.3% (33/35)。其中标本 7、8 的突变比例为 0, 检测突变结果为阴性; 其余标本的突变比例为 0.014%~38.00%, 突变结果检测均为阳性。ddPCR 法检测 BRAF V600E 基因突变比例见图 3。

图 3 ddPCR 法检测 BRAF V600E 基因突变结果

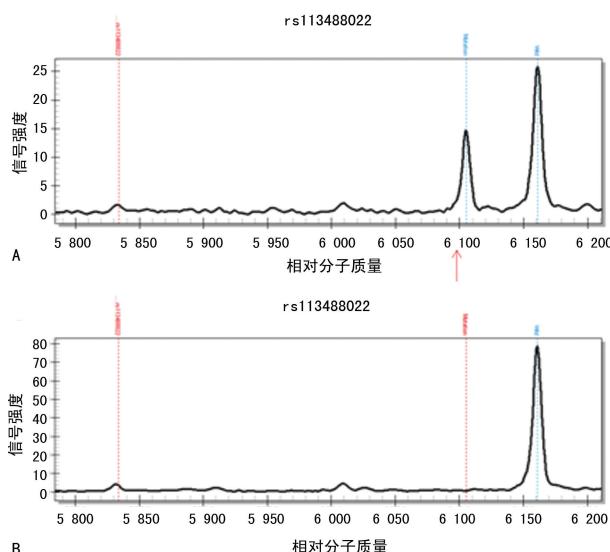
PTC 石蜡标本中, MassARRAY 核酸质谱法检测 BRAF V600E 基因突变阳性率为 74.3% (26/35)。检测结果中, 标本 6、7、8、9、11、18、26、30、35 的质谱图中无突变峰, 为突变检测阴性; 其余标本的质谱图中有突变峰, 为突变检测阳性。见图 4。

2.5 Sanger 测序法检测结果 35 例 PTC 石蜡标本中, Sanger 测序法检测 BRAF V600E 基因突变阳性率为 60.0% (21/35)。其中标本 1、2、7、8、9、11、14、23、24、26、30、31、34、35 的测序结果呈阴性, 其余标本的测序结果呈阳性。见图 5。



注: 根据 BRAF V600E 基因突变图谱计算得到的各标本的突变比例。

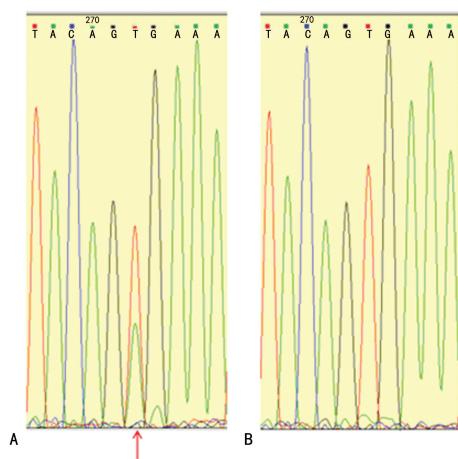
图 3 ddPCR 法检测 BRAF V600E 基因突变结果



注: A 提示质谱图中 Mass 6100 处有突变峰(用箭头标出), 显示 BRAF V600E 密码子突变阳性; B 提示质谱图中 Mass 6100 处无突变峰, 显示 BRAF V600E 密码子突变阴性。

图 4 MassARRAY 核酸质谱法检测 BRAF V600E 基因突变

2.6 BRAF V600E 基因突变检测方法的比较 通过试验发现, 在 4 种检测方法中, ddPCR 法检测既往收集的 PTC 石蜡标本 BRAF V600E 基因突变的灵敏度最佳。将其与另外 3 种检测方法比较, 差异均有统计学意义(P 分别为 0.047、0.031、0.015)。



注:A 提示测序图谱中密码子 600 的 T 处有突变峰(用箭头标出),显示 BRAF V600E 密码子突变阳性;B 提示测序图谱中密码子 600 的 T 处无突变峰,显示 BRAF V600E 密码子突变阴性。

图 5 Sanger 测序法检测 BRAF 基因第 15 号外显子突变

3 讨 论

各医院病理科保存有大量患者肿瘤组织的石蜡标本。石蜡标本经过固定剂、脱水剂、包埋剂等有机溶剂作用后,其基因组 DNA 受到一定程度的破坏,发生降解,使得 DNA 的纯度与水平均降低^[10]。因此,与新鲜组织相比,检测 PTC 石蜡标本中的 BRAF V600E 基因突变的难度增大,本研究即证实了这一观点(与新鲜组织相比,各检测方法的突变阳性率均未达 100%)。故需要寻找灵敏度更高的方法用于 PTC 石蜡标本中 BRAF V600E 基因突变的检测。

以往研究中对 BRAF 基因突变的检测方法主要有免疫组织化学法、限制性片段长度-多态性聚合酶链反应技术(PCR-RFLP)、高分辨率熔解曲线法、测序技术以及实时荧光定量 PCR 技术(qPCR)等^[11]。由于检测方法不同,PTC 组织中 BRAF V600E 基因突变阳性率存在较大差异。国内甲状腺癌 BRAF V600E 基因突变检测方法较多,检测的标本类型众多,检测的灵敏度、特异度差异较大,因而检测结果相距甚远。因此,通过试验选出灵敏度高的检测方法,可以为医院后期临床检测项目的选择提供理论依据,为患者用药提供指导。

Sanger 测序法作为“金标准”,可得到序列的直接信息,对未知突变的检出具有优势,是直接、有效的检测基因突变的方法,但该法检测基因突变的灵敏度较低,试验操作时间长、步骤复杂、易产生污染^[12]。MassARRAY 核酸质谱法具有较高的特异度和灵敏度,可以在一个平台上实现 SNP 基因分型、基因表达检测、基因甲基化分析、病原体分型和进行产前诊断的研究。但对于检测一个位点的突变,其需要设计两次引物进行扩增,步骤较为烦琐^[13]。以 PCR-荧光探针法为平台的突变检测技术,均需根据已知的突变类

型设计引物、探针,因此无法检测出所有可能的突变,但灵敏度较 Sanger 测序法高,操作简单,无须对 PCR 产物进行操作,在很大程度上避免了扩增产物的污染^[14]。ddPCR 法作为核酸定量的新技术,与此前的核酸定量方法相比,该方法的灵敏度、准确度更高。其与 qPCR 最主要的区别在于计算核酸拷贝数方法不同,ddPCR 法采用了新的定量策略和试验思路,可以对核酸的拷贝数进行绝对定量,相对于 qPCR,不需要建立标准曲线,具有更广阔的应用前景^[15]。

本试验采用 Sanger 测序法检测 BRAF 基因第 15 号外显子突变,检测到的突变类型均为 V600E 突变型,未见其他少见的突变类型。本试验中采用灵敏度最高的 ddPCR 法检测 35 例 2013 年收集的 PTC 石蜡标本 BRAF V600E 基因突变(已知新鲜组织 2013 年用 PCR-荧光探针法检测 BRAF V600E 基因突变全阳性),突变阳性率为 94.3%(33/35)。其中标本 7、8 用 4 种方法检测均呈阴性,可能与其纯度不高有关。ddPCR 法无须检测者分析结果,其结果直接由检测系统显示,从而大大降低了人为因素对结果的影响。

4 结 论

综上所述,ddPCR 法检测灵敏度较高,对标本中 DNA 的纯度和水平要求较低,适用于储存年份较久的 PTC 石蜡标本 BRAF V600E 基因突变检测,可为 PTC 的诊断及预后判断提供依据。

参考文献

- [1] TETIANA I B, VLADIMIR A S, MITSUYOSHI H, et al. Comparative histopathological analysis of sporadic pediatric papillary thyroid carcinoma from Japan and Ukraine[J]. Endocr J, 2017, 64(10): 977-993.
- [2] 曾林文,卢江昆,孔祥东,等.甲状腺乳头状癌分子生物学研究进展[J].中国肿瘤临床与康复,2018,25(12):1530-1533.
- [3] BALLESTER L Y, CANTU M D, LIM K P, et al. The use of BRAF V600E mutation-specific immunohistochemistry in pediatric Langerhans cell histiocytosis[J]. Hematol Oncol, 2018, 36(1): 307-315.
- [4] CARASSAI P, JOCOLLÉ G, DONATI G, et al. Does V600E BRAF mutation predict vinorelbine efficacy? A proof-of-concept from a lung micropapillary adenocarcinoma metastatic to the breast[J]. Pathologica, 2017, 109(4): 426-428.
- [5] 赵海月,张桂珍,杨麒巍,等.BRAF V600E 基因突变与甲状腺癌病理生物学特点及其靶向治疗的研究进展[J].中国固体视学与图像分析,2017,22(2):224-229.
- [6] LI J M, LIU J B, YU X M, et al. BRAF (v600e) mutation combined with thyroglobulin and fine-needle aspiration in diagnosis of lymph node metastasis of papillary thyroid carcinoma[J]. Pathol Res Pract, 2018, (下转第 1681 页)

4 结 论

EV71 与 CA16 核酸与抗体检测结果的一致性不高。抗体检测存在交叉反应阳性。核酸检测有助于了解患儿恢复期病毒复制情况, 对确定手足口病患儿在病程 2 周后是否仍需要延长隔离时间以及准确制订隔离期具有较大意义。核酸与抗体联合检测可一定程度上避免单一方法检测的局限性, 有助于提高早期检出率, 为患儿的后续治疗提供可靠依据。

参考文献

- [1] 徐继勋,徐维利. 2015 年度鄂东地区手足口病流行病学监测分析[J]. 中国实验诊断学,2016,20(5):808-810.
- [2] 郭慧娟,莫莉,黄炳坤. 肠道病毒核酸与抗体联合检测在手足口病诊断中的应用价值研究[J]. 国际检验医学杂志,2017,38(11):1488-1489.
- [3] 吴双双,陈东,周俊,等. 手足口病肠道病毒核酸与血清学检测的临床诊断价值分析[J]. 浙江临床医学,2018,20(5):842-843.
- [4] 沈伟峰,邵平扬,殷新光,等. 手足口病患者病原学快速诊断方法的比较研究[J]. 浙江医学,2017,39(14):1179-1182.
- [5] 陈士伟,王洁,周仁希,等. 2015 年杭州市手足口病肠道病毒 71 型和柯萨奇病毒 A 组 16 型构成变化与联合检测方法分析[J]. 疾病监测,2017,32(2):102-105.
- [6] 朱耀武,王春玉,潘莹莹,等. EB 病毒核酸及血清学检测

(上接第 1677 页)

214(11):1892-1897.

- [7] MA Y J, DENG X L, LI H Q, et al. Correlation between BRAF (V600E) mutation and clinicopathological features in pediatric papillary thyroid carcinoma[J]. Sci China Life Sci, 2017,60(7):729-738.
- [8] LIU L H, CHANG J W, JUNG S N, et al. Clinical implications of the extent of BRAF (V600E) alleles in patients with papillary thyroid carcinoma[J]. Oral Oncol, 2016,62(11):72-77.
- [9] KIM J K, SEONG C Y, BAE I E, et al. Comparison of immunohistochemistry and direct sequencing methods for identification of the BRAF (V600E) mutation in papillary thyroid carcinoma[J]. Ann Surg Oncol, 2018, 25(6):1775-1781.
- [10] TEIXEIRA A C, FREIRE DE CARVALHO C C, MORO RÓ G P, et al. Evaluation of frozen and paraffin sections using the Maryland aggregate pathology index score in donor kidney biopsy specimens of a Brazilian cohort[J]. Transplant Proc, 2017,49(10):2247-2250.
- [11] CHO M, AKIBA C, LAU C, et al. Impact of RAS and

在 EB 病毒相关疾病中的应用研究[J]. 中华检验医学杂志,2017,40(3):195-200.

- [7] 叶淦康,张应洪,彭琪,等. 手足口病诊断中肠道病毒 71 型核酸与抗体检测的应用意义探究[J]. 自求恩医学杂志,2016,14(3):311-312.
- [8] 吴亦栋,周俊,陈东,等. 肠道病毒核酸与抗体联合检测在手足口病病原体早期诊断中的应用[J]. 中华检验医学杂志,2015,38(6):397-401.
- [9] 代芳芳,何菡,李润青,等. 2010 至 2012 年手足口病病原学检测变化与分析[J]. 中华检验医学杂志,2013,36(12):1140-1142.
- [10] 陈倩,胡正,张其华,等. 多重 Taqman 探针实时 RT-PCR 检测手足口病病原体方法的建立及临床应用[J]. 中华检验医学杂志,2013,36(9):845-849.
- [11] 杜潘艳,王晓波,王宝林,等. 肠道病毒 71 感染病毒载量与细胞因子和免疫球蛋白水平的相关性[J]. 中华实验和临床病毒学杂志,2015,29(6):479-482.
- [12] 张艳艳. IL-12/IFN- γ 轴基因多态性与 EV71 感染手足口病易感性相关研究[D]. 南宁:广西医科大学,2016:1-77.
- [13] 陈健明,陈胜棣,黄绮云,等. 手足口病患儿的肠道病毒核酸转阴时间探讨[J]. 新医学,2018,49(9):651-655.
- [14] 袁翊,王娅梅,万小涛,等. 内江地区手足口病肠道病毒核酸检测及流行特征分析[J]. 检验医学与临床,2017,14(12):1717-1719.

(收稿日期:2019-08-18 修回日期:2020-03-25)

BRAF mutations on carcinoembryonic antigen production and pattern of colorectal metastases[J]. World J Gastrointest Oncol, 2016,8(1):128-135.

- [12] CHANG Y S, HUANG H D, YEH K T, et al. Evaluation of whole exome sequencing by targeted gene sequencing and Sanger sequencing[J]. Clin Chim Acta, 2017,471(8):222-232.
- [13] TIAN H X, ZHAO X C, WANG Z, et al. Establishment and application of a multiplex genetic mutation-detection method of lung cancer based on MassARRAY platform [J]. Cancer Biol Med, 2016,13(1):68-76.
- [14] ANTHONY Y H, BUDD M, DENG D, et al. A monochrome multiplex qPCR assay for the measurement of mitochondrial DNA content[J]. J Molec Diag, 2018, 20(5):612-620.
- [15] FORTHUN R B, HOVLAND R, SCHUSTER C, et al. ctDNA detected by ddPCR reveals changes in tumour load in metastatic malignant melanoma treated with bevacizumab[J]. Sci Rep, 2019,9(1):17471-17485.

(收稿日期:2019-11-29 修回日期:2020-02-28)