

生物检定

流感减毒活疫苗诱导的粘膜反应 IgA 抗体检测方法的可行性分析*

赵慧¹, 周慧明², 赵雪², 袁若森², 李娟¹, 姜春来², 李长贵^{1**}

(1. 中国食品药品检定研究院 呼吸道病毒疫苗室 卫生部生物技术产品检定方法及其标准化重点实验室, 北京 102629;
2. 长春百克生物科技股份公司研发部, 长春 130012)

摘要 目的: 对建立的检测流感病毒特异性 IgA 抗体检测方法进行验证, 并且用于评价流感减毒活疫苗(LAIV)粘膜免疫反应。方法: 使用来自英国生物制品所(NIBSC)的流感抗原国际参考品作为包被抗原, 检测鼻咽拭子阳性样品, 确定流感病毒型别特异性的 IgA 抗体滴度, 考察该方法的特异性; 通过对高低不同抗体滴度的阳性样本多次平行检测来评价该方法的重复性; 在此基础上, 对 526 份鼻咽拭子样本进行 IgA 抗体滴度检测。结果: 只针对包被抗原阳性的样品检测到高滴度的 IgA 抗体, 其他型别的抗体未检测到, 方法特异性显著。鼻咽拭子 IgA 抗体检测方法的组间重复性、组内重复性、方法重复性良好。检测接种 LAIV 疫苗免疫前后的鼻咽拭子样本, 疫苗组 H1N1、H3N2 以及 B 型 IgA 抗体几何平均滴度(GMT)接种前后的比值分别为 1.15、1.45 和 1.18, 均高于安慰剂组; 疫苗接种组 IgA 抗体滴度高于免疫前 2 倍的比率, 也高于安慰剂对照组 ($P < 0.05$)。鼻咽拭子 IgA 抗体检测结果与血清样本 HI 抗体结果缺乏相关性 ($P < 0.001$)。结论: 建立的流感病毒特异性 IgA 抗体的检测方法能够满足 LAIV 粘膜免疫评价的需要。
关键词: 流感减毒活疫苗(LAIV); IgA; 黏膜免疫; 间接酶联免疫吸附试验

中图分类号: R 917 文献标识码: A 文章编号: 0254-1793(2019)11-2041-06
doi: 10.16155/j.0254-1793.2019.11.16

Feasibility of IgA antibody detection method for evaluating the mucosal response induced by live attenuated influenza vaccine*

ZHAO Hui¹, ZHOU Hui-ming², ZHAO Xue², YUAN Ruo-sen²,
LI Juan¹, JIANG Chun-lai², LI Chang-gui^{1**}

(1. Key laboratory of the Ministry of Health for Research on Quality and Standardization of Biotech Products, Division of Respiratory Virus Vaccines, National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 102629, China; 2. Research and Development Department of Changchun Baike Biotechnology Co., Ltd., Changchun 130012, China)

Abstract Objective: To validate the established method for detecting influenza virus specific immunoglobulin A (IgA) antibody and to evaluate the mucosal immune responses induced by live attenuated influenza vaccine (LAIV).

* 北京市自然科学基金项目(7173277); 中国食品药品检定研究院学科带头人培养基金(2015X7)

** 通信作者 Tel:(010)53152415; E-mail: changguili@aliyun.com
第一作者 Tel:(010)53152415; E-mail: zh8033@126.com

Methods: International reference strains from The National Institute for Biological Standards and Control (NIBSC) were used as coating antigen to test nasopharyngeal swab positive samples in order to determine the influenza virus specific IgA antibody titer and the specificity of the method. Reproducibility was evaluated by parallel testing of nasal samples at high and low antibody titers. On the basis of the test, 526 nasopharyngeal swab samples were tested for IgA antibody titer. **Results:** Only high titers of IgA antibodies were detected for samples that were positive for the coating antigen, other types of antibodies were not detected, indicating that the method had good specificity. The intergroup reproducibility, intra-group reproducibility and method reproducibility were good. The ratios of GMTs for IgA titers against homologous H1N1, H3N2 and B virus in nasopharyngeal swabs before and after the inoculation were 1.15, 1.45 and 1.18 respectively, which were higher than those in placebo group. The ratio of the subjects receiving LAIV with at least a 2-fold increase was higher than that of placebo subjects ($P < 0.05$). There was no correlation between the results of IgA antibody detection in nasopharyngeal swabs and HI antibody results in serum samples ($P < 0.001$). **Conclusion:** The established influenza-specific IgA antibody detection method can meet the detection requirements of LAIV, which can be applied for assessing the mucosal immune effects of influenza vaccine.

Keywords: live attenuated influenza vaccine; immunoglobulin A; mucosal immunity; indirect ELISA

流行性感冒简称流感,是流感病毒引起的急性呼吸道感染性疾病^[1],具有高发病率和高死亡率的特点,给人类健康和社会经济带来了巨大的负担^[2],每年注射流感疫苗是降低流感感染的最有效手段。目前上市的流感疫苗有2种:流感灭活疫苗(inactivated influenza vaccine, IIV)和流感减毒活疫苗(live attenuated influenza vaccine, LAIV)。LAIV通过鼻腔接种,模拟病毒自然感染,在鼻粘膜局部诱导产生分泌型IgA抗体^[3],从而在流感病毒首次侵入人体的物理位置直接提供第一线防护,然后再激发潜在的系统性细胞免疫和抗体反应^[4-7]。LAIV针对同型流感病毒,为成人和儿童提供了与IIV相似的保护率^[8],甚至对异型流感病毒产生交叉保护作用^[9]。血凝抑制试验(hemagglutination inhibition, HI)是评价灭活流感疫苗的重要指标,血凝效价大于1:40被认为与季节性流感疫苗保护作用相关,但是相比IIV,接种LAIV产生较低的HI抗体滴度和阳转率^[10]。有研究表明,接种LAIV后鼻粘膜的IgA抗体在抵御流感病毒的感染中发挥重要作用^[11]。本研究对本实验室建立的鼻拭子IgA酶联免疫吸附试验(IgA-ELISA)进行验证,并初步应用于国产LAIV疫苗免疫效果的评价。

1 材料和方法

1.1 抗原和鼻咽拭子样本 H1N1(A/California/7/2009)、H3N2(A/Switzerland/9715293/2013)及B(B/Phuket/3073/2013)抗原购自英国生物制品所;鼻咽

拭子样品来自接种长春百克生物科技股份有限公司研制的LAIV疫苗志愿者。

1.2 主要试剂和仪器 辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)标记的羊抗人IgA二抗购自Sigma公司;酶标板为Corning公司产品;TMB显色液购自KPL公司;鼻咽拭子样本保存液购自友康恒业生物科技(北京)有限公司。吐温20购自Sigma公司;牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA)购自AMRESCO公司;磷酸盐缓冲液(phosphate buffer, PBS),购自北京中杉金桥生物技术有限公司;酶标仪(Multiskan Ascent)购自Thermo公司。

1.3 IgA检测方法 用磷酸盐缓冲液(PBS)稀释H1N1、H3N2及B抗原至 $0.5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, $100 \mu\text{L} \cdot \text{孔}^{-1}$ 加入酶标板,置4℃包被过夜;用含有0.05% Tween 20的PBS(PBST)洗板3次,加入含1% BSA的PBS封闭液,37℃封闭2h;洗板3次,使用含有2%脱脂奶粉的PBST将样本做1:4, 1:8, 1:16, 1:32倍稀释,按每孔100 μL加至ELISA板中,空白对照为样品稀释液,37℃孵育1h;PBST洗涤3次,每孔加入100 μL辣根过氧化物酶标记的羊抗人IgA抗体(1:4 000), $10 000 \cdot \text{孔}^{-1}$, 37℃孵育1h;用PBST洗涤5次,加入TMB显色液, $100 \mu\text{L} \cdot \text{孔}^{-1}$, 25℃孵育30 min;加入50 μL $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 硫酸终止反应,酶标仪检测 A_{450} 。滴度结果判定:样本 $A \geq$ 空白对照的平均 A 的2倍则判为阳性,样本呈阳性的最高稀释度即为该样品IgA

抗体滴度。

1.4 HI 试验 0.1 mL 待检血清预先加入 0.4 mL 霍乱滤液, 37 °C 处理 16 h 后, 以鸡血球吸附过夜, 取上清进行试验, 血清滴度以稀释倍数倒数表示。血清起始稀释倍数为 1:5, 起始倍数为阴性时, 按惯例判定 HI 滴度为 2.5。

1.5 特异性分析 流感病毒 H1N1、H3N2 和 B 型 IgA 抗体阳性鼻咽拭子样品各 1 份检测, 分别进行 2 倍系列稀释, 共设置 8 个稀释度, 测定 A_{450} , 计算样本的 IgA 抗体滴度, 用以考察该方法的特异性。

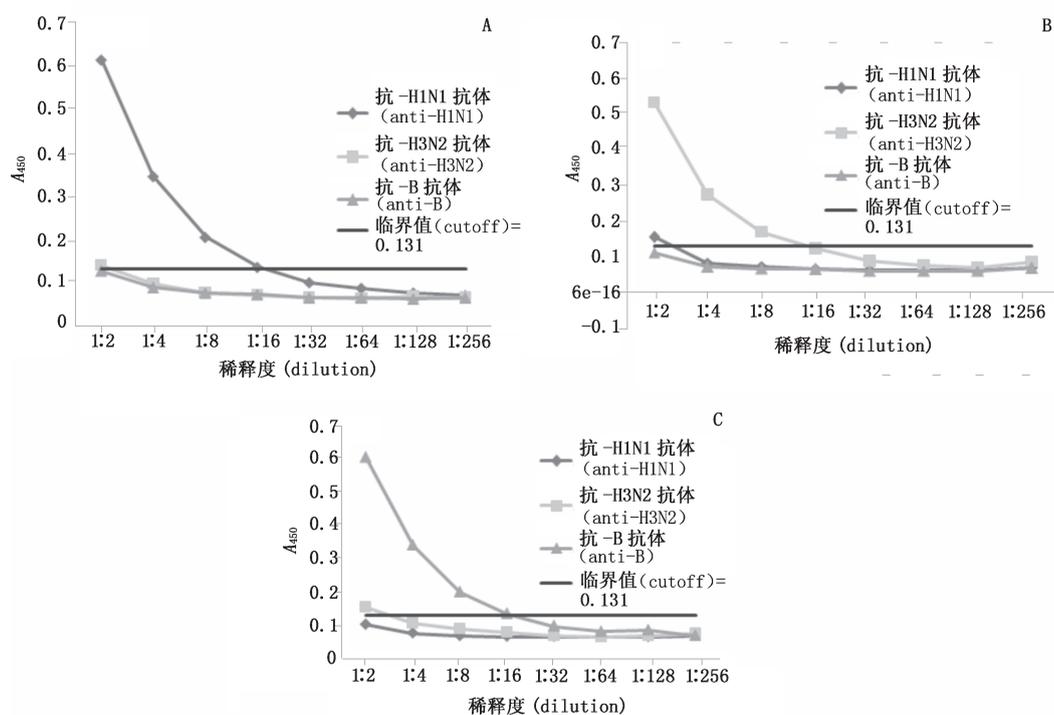
1.6 精密性分析 多次平行检测不同型流感病毒 IgA 抗体阳性样本, 考察该方法的重复性。

1.7 初步应用 收集长春百克生物科技股份有限公司研发的鼻喷冻干 LAIV II 期临床试验中 3~17 岁本年度

未接种过流感疫苗的志愿者血清样本, 接种 LAIV 前和接种 31 d 后鼻咽拭子样本采用 IgA ELISA 检测 IgA 抗体, 采用 HI 方法对收集的血清样本检测 HI 抗体。

2 结果

2.1 IgA-ELISA 的特异性 如图 1-A 所示, H1N1 病毒的剂量反应曲线显示 H1N1 型阳性样品具有较高的 IgA 抗体滴度, 抗体滴度为 16, 而 H3N2 和 B 型 IgA 抗体阳性样本抗体滴度为阴性, 滴度小于或者等于 2; H3N2 病毒的剂量反应曲线显示针对 H3N2 抗原 H3N2 型阳性样品抗体滴度为 8, 而 H1N1 和 B 型阳性样品抗体滴度均为滴度小于或者等于 2, 为阴性 (如图 1-B)。B 型作为包被抗原, 结果类似。B 型阳性样品抗体滴度为 8, 其他两型抗体滴度均为阴性 (如图 1-C)。



A. H1N1 型病毒的剂量反应曲线 (the dose response of H1N1 virus) B. H3N2 型病毒的剂量反应曲线 (the dose response of H3N2 virus) C. B 型病毒的剂量反应曲线 (the dose response of B virus)

图 1 IgA-ELISA 方法的特异性

Fig. 1 Specificity of IgA-ELISA method

2.2 IgA-ELISA 的精密性 用同一批抗原包被 ELISA 板, 按照已确定的 ELISA 方法, 对不同型别流感病毒的高低浓度各 2 份鼻咽拭子样本进行检测, 每个样品做 5 次独立重复试验, 根据检测样本的 A_{450} , 计算组内重复性试验的 5 次平行试验结果的 RSD 在 3.3%~10.9%, 平均值为 6.9%, 同一样本不同工作日

的 RSD 为 7.5%~9.8%, 平均值为 8.3%, 结果见表 1。组内重复性中样品 1 的 H1N1、H3N2 和 B 型 IgA 抗体滴度几何均值为 1:32, 1:32 和 1:16, RSD 均为 0; 组间重复性样品 1 的 3 种型别流感病毒 IgA 抗体滴度几何均值分别为 1:32, 1:32 和 1:16, RSD 均为 0。

表 1 精密性试验结果 (A_{450} , $n=5$)

Tab. 1 Results of precision test

样品 (sample)	病毒 (virus)	组内重复性 (inter-group reproducibility)		组间重复性 (intra-group reproducibility)	
		$\bar{X} \pm SD$	RSD/%	$\bar{X} \pm SD$	RSD/%
1	H1N1	0.475 ± 0.052	10.9	0.344 ± 0.034	9.8
	H3N2	0.636 ± 0.021	3.3	0.240 ± 0.018	7.5
	B	0.532 ± 0.032	5.9	0.359 ± 0.033	9.2
2	H1N1	0.344 ± 0.034	9.8	0.345 ± 0.024	6.9
	H3N2	0.232 ± 0.015	6.6	0.240 ± 0.018	7.5
	B	0.331 ± 0.016	4.9	0.359 ± 0.033	9.2

2.3 间接 ELISA 检测方法的初步应用

用该方法检测鼻咽拭子样品 1 052 份,其中滴鼻接种 LAIV 免疫前和免疫后样本各 351 份,注射生理盐水安慰剂接种前和接种后样本各 175 份。检测结果见表 2。疫苗组 H1N1、H3N2 以及 B 型 IgA 抗体几何平均滴度 (GMT) 接种前后的比值分别为 1.15, 1.45 和 1.18, 均高于安慰剂组; 疫苗接种组 IgA 抗体滴度高于免疫前 2 倍的比率 (IgA 抗体反应率), 也高于安慰剂对照组, 但是 H1N1 IgA 反应率疫苗组与安慰剂组相比无统计学差异 ($X^2=2.192$, $P=0.139$), H3N2 型与 B 型 IgA 抗体反应率疫苗组与安慰剂组有明显统计学差异 (H1N1: $X^2=15.303$,

$P=0.000$; B: $X^2=7.177$, $P=0.007$)。疫苗组 H3N2 型 HI 抗体接种后滴度大于接种前 4 倍 (HI 抗体阳转率) 的受试者比率是 12.25%, 而安慰剂组比率是 2.29%, 具有统计学差异 ($X^2=14.251$, $P=0.000$), H1N1 和 B 型 HI 抗体阳转率疫苗组和安慰剂组相比均无统计学差异 (H1N1: $P=0.351$; B: $P=0.144$)。疫苗组中 H1N1 型 IgA 抗体增长 2 倍的受试者中只有 3% HI 抗体滴度也大于 4 倍; H3N2 IgA 反应阳性的受试者仅有 23% HI 抗体阳转, B 型 IgA 抗体反应阳性的受试者中 12% HI 抗体阳转。IgA 抗体检测结果与血清样本 HI 抗体结果缺乏相关性 ($P<0.001$)。

表 2 接种 LAIV 免疫前后 HI 和 IgA 抗体结果

Tab. 2 The results of influenza HI and IgA antibodies after and before inoculation with LAIV

病毒 (virus)	组别 (group)	HI [95% 可信区间 (95% confidence interval, 95%CI)]			IgA [95% 可信区间 (95% confidence interval, 95%CI)]		
		免疫前 (preimmunization)	免疫后 31 d (31 days after immunization)	血清阳转例数 (率, %) [number of seroconversion (positive conversion rate, %)]	免疫前 (preimmunization)	免疫后 31 d (31 days after immunization)	血清阳转例数 (率, %) [number of seroconversion (positive conversion rate, %)]
H1N1	安慰剂 (placebo)	26.08 (21.28~31.96)	33.21 (27.12~40.65)	2/175 (1.14%)	3.33 (2.96~3.74)	3.32 (2.94~3.74)	43/175 (24.57%)
	疫苗组 (vaccine)	28.48 (24.82~32.69)	38.76 (33.76~44.49)	9/351 (2.56%)	3.34 (3.07~3.63)	3.85 (3.50~4.23)	108/351 (30.77%)
H3N2	安慰剂 (placebo)	72.46 (63.53~82.64)	95.61 (84.99~107.55)	4/175 (2.29%)	3.09 (2.79~3.42)	3.14 (2.80~3.52)	38/175 (21.71%)
	疫苗组 (vaccine)	88.48 (80.40~97.36)	140.17 (129.58~151.63)	43/351 (12.25%)	3.14 (2.92~3.39)	4.55 (4.11~5.04)	136/351 (38.75%)
B	安慰剂 (placebo)	40.64 (34.99~47.19)	58.04 (51.18~65.83)	12/175 (6.86%)	3.29 (2.93~3.69)	3.26 (2.89~3.69)	35/175 (20%)
	疫苗组 (vaccine)	47.69 (42.92~52.99)	74.22 (68.22~80.75)	38/351 (10.82%)	3.17 (2.94~3.41)	3.73 (3.41~4.09)	109/351 (31.05%)

3 讨论

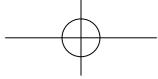
LAIV 通过鼻腔接种,模拟流感病毒自然感染,首先在上呼吸道粘膜诱导分泌型 IgA 抗体^[12],从而形成机体防卫的第一道防线,接种 LAIV 诱导产生的 IgA 抗体在疫苗对流感病毒的保护中发挥重要作用。本研究对建立的针对不用流感亚型特异的 IgA 抗体检测方法进行方法学性能验证,使用来自英国生物制品所的国家参考品作为包被抗原,检测不同流感型别 IgA 抗体鼻咽拭子阳性样品。结果显示,只有针对包被抗原阳性的样品检测到高滴度的 IgA 抗体,其他型别的抗体未检测到,方法特异性显著。通过对 2 个不同抗体滴度水平的阳性样品多次重复检测,根据吸光度计算的 RSD 均在 11% 以内,抗体滴度没有变化,计算的 RSD 为 0,方法具有较好的重复性。

2003 年美国 Medimmune 公司成功研发出全球第一支 LAIV 并上市,2012 年四价 LAIV 被美国食品药品监督管理局批准用于 2~49 岁健康人群以预防季节性流感。10 多年的使用证明 LAIV 在成人中的保护效果比 TIV 差^[13],但是在 6 月龄~18 岁儿童中的保护作用优于 TIV^[14-16]。国外文献报道 LAIV 在 2~17 岁儿童中对流感的保护率在 78%~87% 之间^[9]。在 2014 年 6 月,美国免疫接种咨询委员会 (Advisory Committee on Immunization Practices, ACIP) 建议在 2~8 岁儿童中使用 LAIV^[17]。TIV 采用肌肉注射,产生的系统性 IgG 抗体通过经典的 HI 评价,HI 抗体滴度 \geq 体滴被认为具有保护作用。与 TIV 的保护机制不用,LAIV 通过鼻腔接种,主要是在局部产生粘膜 IgA 抗体而不是系统性 IgG 抗体发挥作用^[18]。本文实验结果显示,检测接种 LAIV 后 31 d H3N2 型和 B 型 IgA 抗体滴度升高 2 倍的人分别为 136 人和 109 人,占疫苗接种者 38.75% 和人 31.05%,显著高于基于 HI 抗体计算的阳转率。H1N1 IgA 反应率疫苗组与安慰剂组无统计学差异,与近年来文献报道的一致,目前没有明确的原因,可能与 H1N1 流行株的特点以及疫苗的组成等因素有关^[20]。针对 2~3 岁儿童接种 LAIV IgA 抗体的分析报道中指出^[19],针对 H1N1 型接种 LAIV 疫苗的 IgA 抗体阳性率在 26%~39%,安慰剂组 IgA 抗体阳性率在 12%~30%。H3N2 型 IgA 抗体阳性率在 33%~48%,安慰剂组在 20%~27%。B 型 IgA 抗体阳性率在 46%~59%,安慰剂组在 14%~38%。H1N1 和 H3N2 的结果均在国外文献报道范围内。B 型疫苗组 IgA 抗体阳性率 31.05%,低于文献报道,可

能与当年 B 型流行范围有关。此外,结果显示疫苗组中 IgA 抗体增长 2 倍的受试者中只有 3%~23% 的 HI 抗体滴度大于 4 倍。IgA 抗体检测结果与血清样本 HI 抗体结果缺乏相关性 ($P>0.05$)。与国外报道一致,不同于 IIV,接种 LAIV 后鼻粘膜的 IgA 抗体可为儿童抵御流感病毒的感染提供有效保护^[21]。综上所述,本文建立的 IgA-ELISA 检测方法特异强,重复性好,操作简便,为 LAIV 疫苗效果评价以及后续免疫程序的优化奠定了基础。

参考文献

- [1] IULIANO AD, ROGUSKI KM, CHANG HH, *et al.* Global seasonal influenza-associated mortality collaborator network. Estimates of global seasonal influenza-associated respiratory mortality: a modelling study [J]. *Lancet*, 2018, 391 (10127): 1285
- [2] FOPPA IM, CHENG PY, REYNOLDS SB, *et al.* Deaths averted by influenza vaccination in the U. S. during the seasons 2005/06 through 2013/14 [J]. *Vaccine*, 2015, 33 (26): 3003
- [3] MOHN KGI, BREDHOLT G, BROKSTAD KA, *et al.* Longevity of B-cell and T-cell responses after live attenuated influenza vaccination in children [J]. *J Infect Dis*, 2014, 211 (10): 1541
- [4] CAO RG, SUAREZ NM, OBERMOSER G, *et al.* Differences in antibody responses between trivalent inactivated influenza vaccine and live attenuated influenza vaccine correlate with the kinetics and magnitude of interferon signaling in children [J]. *J Infect Dis*, 2014, 210 (2): 224
- [5] CHENG X, ZENGEL JR, SUGUITAN AL, *et al.* Evaluation of the humoral and cellular immune responses elicited by the live attenuated and inactivated influenza vaccines and their roles in heterologous protection in ferrets [J]. *J Infect Dis*, 2013, 208 (4): 594
- [6] MOHN KGI, BROKSTAD KA, PATHIRANA RD, *et al.* Live attenuated influenza vaccine in children induces B-cell responses in tonsils [J]. *J Infect Dis*, 2016, 214 (5): 722
- [7] COLE KS, MARTIN JM, HORNE WT, *et al.* Differential gene expression elicited by children in response to the 2015-16 live attenuated versus inactivated influenza vaccine [J]. *Vaccine*, 2017, 35 (49): 6893
- [8] AMBROSE CS, LEVIN MJ, BELSHE RB. The relative efficacy of trivalent live attenuated and inactivated influenza vaccines in children and adults [J]. *Influenza Other Resp*, 2011, 5 (2): 67
- [9] AMBROSE CS, WU X, KNUF M, *et al.* The efficacy of intranasal live attenuated influenza vaccine in children 2 through 17 years of age: a meta-analysis of randomized controlled studies [J]. *Vaccine*, 2012, 30 (5): 886
- [10] NETO HB, FARHAT CK, TREGNAGHI MW, *et al.* Efficacy and safety of 1 and 2 doses of live attenuated influenza vaccine in



- vaccine-naive children [J]. *Pediatr Infect Dis J*, 2009, 28(5): 365
- [11] AMBROSE CS, WU X, JONES T, *et al.* The role of nasal IgA in children vaccinated with live attenuated influenza vaccine [J]. *Vaccine*, 2012, 30(48): 6794
- [12] HE Y, ABID A, FISHER R, *et al.* Mucosal antibody responses are directed by viral burden in children with acute influenza infection [J]. *Influenza Other Respir Viruses*, 2013, 7(1): 46
- [13] MONTO AS, OHMIT SE, PETRIE JG, *et al.* Comparative efficacy of inactivated and live attenuated influenza vaccines [J]. *N Engl J Med*, 2009, 361(13): 1260
- [14] ASHKENAZI S, VERTRUYEN A, ARISTEGUI J, *et al.* Superior relative efficacy of live attenuated influenza vaccine compared with inactivated influenza vaccine in young children with recurrent respiratory tract infections [J]. *Pediatr Infect Dis J*, 2006, 25(10): 870
- [15] BELSHE RB, EDWARDS KM, VESIKARI T, *et al.* Live attenuated versus inactivated influenza vaccine in infants and young children [J]. *N Engl J Med*, 2007, 356(7): 685
- [16] FLEMING DM, CROVARI P, WAHN U, *et al.* Comparison of the efficacy and safety of live attenuated cold-adapted influenza vaccine, trivalent, with trivalent inactivated influenza virus vaccine in children and adolescents with asthma [J]. *Pediatr Infect Dis J*, 2006, 25(10): 860
- [17] GROHSKOPF LA, OLSEN SJ, SOKOLOV LZ, *et al.* Prevention and control of seasonal influenza with vaccines: recommendations of the advisory committee on immunization practices (ACIP) — United States, 2014–15 influenza season [J]. *MMWR*, 2014, 63(30): 691
- [18] BARRÍ A MI, GARRIDO JL, STEIN C, *et al.* Localized mucosal response to intranasal live attenuated influenza vaccine in adults [J]. *J Infect Dis*, 2012, 207(1): 115
- [19] AMBROSE CS, WU X, JONES T, *et al.* The role of nasal IgA in children vaccinated with live attenuated influenza vaccine [J]. *Vaccine*, 2012, 30(48): 6794
- [20] PEBODY R, MCMENAMIN J, NOHYNEK H. Live attenuated influenza vaccine (LAIV): recent effectiveness results from the USA and implications for LAIV programmes elsewhere [J]. *Arch Dis Child*, 2018, 103(1): 101
- [21] HOFT DF, LOTTENBACH KR, BLAZEVIC A, *et al.* Comparisons of the humoral and cellular immune responses induced by live attenuated influenza vaccine and inactivated influenza vaccine in adults [J]. *Clin Vaccine Immunol*, 2017, 24(1): e00414

(本文于 2019 年 9 月 18 日修改回)