

核酸 POCT 检测技术的研究现状、应用及发展

李欣霖, 陈思, 冯倚帆, 刘志坚, 李世宝 (徐州医科大学附属医院检验科, 江苏徐州 221000)

摘要: POCT 技术在疾病的快速诊断过程中发挥着重要作用。等温扩增技术因其可在恒定温度下完成核酸扩增, 降低了对加热装置的要求, 使核酸 POCT 检测成为可能。同时微流控技术、微电子机械系统和纳米技术的发展, 也推动核酸 POCT 检测向高灵敏、快速、便携的方向进步。该文从简易样本前处理方法、基于等温扩增的 POCT 检测技术和无需扩增的 POCT 检测技术等方面系统介绍了核酸 POCT 检测领域的研究现状及未来的发展方向。此外, 该文还强调了智能手机和人工智能在核酸 POCT 检测中起到的重要作用。通过这些技术的融合和创新, 核酸 POCT 检测有望在未来的医疗实践中发挥更大的作用。

关键词: 核酸检测; POCT 检测; 等温扩增; CRISPR; 微流控系统; 人工智能

中图分类号: R446

文献标志码: A

由各种致命性病原微生物引起的急性传染病在全球范围内的爆发给世界公共卫生造成了严重威胁, 如埃博拉病毒 (Ebola Virus)、中东呼吸综合征病毒 (MERS-CoV) 以及新型冠状病毒 (SARS-CoV-2) 等, 对人类的生命健康和全球经济发展造成了巨大影响。为了达到快速诊断疾病的目的, 各种实验室检测方法应运而生, 其中聚合酶链式反应 (polymerase chain reaction, PCR) 技术因其具有较高的灵敏度和特异性被认为是核酸检测的金标准。但 PCR 步骤繁琐, 检测周期长且需要专业技术人员, 同时昂贵的扩增仪器和荧光检测设备也限制了其在资源匮乏地区和基层医院的应用。核酸 POCT 检测简化了样本处理步骤, 采用等温扩增甚至无需扩增的方法在短时间内完成核酸检测并通过便携的检测装置进行结果判读, 一定程度上克服了常规 PCR 的局限性, 对于急性传染病的快速筛查和早期诊断具有重要的意义。

目前随着纳米技术、微流体技术、微电子机械系统及数据分析系统的兴起, 极大促进了 POCT 检测的发展^[1]。本文重点介绍了用于急性传染病检测的核酸 POCT 前沿技术, 包括各种等温扩增 POCT 检测技术和基于规律间隔成簇短回文重复序列技术 (clustered regularly interspersed short palindromic repeats, CRISPR) 等无需扩增的 POCT 检测技术。此外, 笔者还系统分析了目前核酸 POCT 检测技术存在的局限性, 并对其未来的发展方向进行概述, 希望可以为传染性疾病预防 POCT 检测技术的发展提供参考。

1 核酸 POCT 检测的样本前处理方法

原始样本中可能存在各种内源性抑制物影响核酸扩增反应, 特别是在病原体浓度较低时, 需要对原始样本中的核酸进行分离、纯化从而保证扩增结果的高敏感性。为了满足核酸 POCT 检测的便携性、一体化和自动化要求, 研究人员开发了许多高效、简便的核酸提取和纯化方法。Jiang 等^[2]设计了一种球阀结构的样本前处理装置, 通过顺序释放存放于各个模块内的裂解液, 实现 RNA 的富集和扩增。

该方法不仅具有良好的核酸纯化能力, 还大大减少了交叉污染的机会。Phillips 等^[3]使用纳米微孔膜直接从全血中分离出 HIV 病毒颗粒, 极大地简化了样本前处理步骤。此外, 微流控芯片的发展也为核酸提取方法革新提供了有力的技术支持, 通过芯片中特定的流体管道系统依次将缓冲液引入反应区, 从而实现核酸提取及纯化^[4], 实现了真正意义上的“样本进—结果出”。该方法具有高效率、高可靠性以及易于和反应模块整合等优点, 是一种非常适用于 POCT 检测的样本前处理方法。

2 核酸等温扩增 POCT 检测

传统的 PCR 反应依赖加热装置提供的变温过程实现核酸指数级扩增, 需要 1 h 甚至更长的时间才能完成检测, 加上仪器高功耗的缺点, 限制了其在 POCT 检测方面的应用^[5]。但随着各种等温扩增技术的兴起, 不仅极大缩短了反应时间, 同时降低了对反应设备的要求, 并在此基础上衍生出了丰富多样的核酸 POCT 检测方法。

2.1 重组酶聚合酶等温扩增 重组酶聚合酶等温扩增技术 (recombinase polymerase amplification, RPA) 主要以重组酶、单链结合蛋白、链置换 DNA 聚合酶及一对特异性引物完成模板 DNA 扩增, 可以在 37~42 °C 条件下, 15~30 min 内完成目的基因的检测。同其他等温扩增技术相比, RPA 对扩增温度要求低, 对样本耐受性高, 并且试剂可以以冻干的形式保存, 便于运输和储存^[6], 目前广泛应用于体外诊断、生物安全、食品安全等领域^[7-10]。在 RPA 基础上加上不同类型的探针可以实现不同的检测效果, 陈杉等^[11]使用特殊的 Exo 荧光探针, 利用手机获取荧光信号, 实现了对乙肝病毒 DNA 的可视化检测。而 RPA 与 CRISPR 技术的结合, 使检测灵敏度达到阿摩尔 (attomole) 级并且能够对单碱基差异进行识别。Gootenberg 等^[12]基于此方法设计了名为“SHERLOCK”的核酸检测平台用于寨卡病毒和登革热病毒的检测, 为快速、灵敏的核酸 POCT 检测提供了新的技术方

案。随后, Arizti-Sanz 等^[13]将 SHERLOCK 的反应步骤简化为 1 个单步反应, 检测灵敏度和特异性同 RT-qPCR 相当, 显著提高了新型冠状病毒诊断能力。核酸定量检测在病原体检测中具有较高的应用价值, 数字 RPA 是一种可靠的核酸绝对定量等温扩增方法, Li 等^[14]开发了一种 PWA 阵列芯片, 采用刮液刀片使样本均匀分布于微孔中进行独立的 RPA 反应, 对不同浓度的产单核李斯特菌进行定量分析, 平均误差在 11% 以内。并且通过硅烷剂钝化芯片表面的方法消除了扩增过程中交叉污染现象, 是一种简单、高度敏感的核酸绝对定量 POCT 检测方法。虽然 RPA 技术扩增时间短, 反应条件要求低, 并且对碱基错配有一定的容错率, 但该方法容易出现非特异性扩增, 且商品化的试剂盒较少, 限制了其在临床上的应用^[15]。

2.2 环介导等温扩增 环介导等温扩增 (Loop-mediated isothermal amplification, LAMP) 反应主要由两组特异性引物和具有链置换活性的 DNA 聚合酶完成。在反应起始阶段, 外引物 (B3、F3) 将内引物 (BIP、FIP) 延伸产物置换出来, 产生的单链 DNA 两端可以杂交形成哑铃状的茎环结构, 该结构本身自带引物, 故而可以以自身为模板进行扩增, 同时内引物与环状结构区匹配延伸并置换出自身延伸产物, 通过此种方式的不断循环, 从而完成扩增^[16], 其能够在等温条件下高特异性、高效率、快速扩增核酸 DNA, 但该方法的引物设计复杂、易产生非特异性扩增^[17]。Joung 等^[18]在 SHERLOCK 的基础上, 利用 LAMP 联合 CRISPER 方法对新型冠状病毒进行检测, 具有高特异性、高灵敏度的优点 (100 个拷贝/反应)。但该方法需要数次开盖加样及检测, 无法完全避免样品间交叉污染, 对于实验环境有着较高的要求。而微流控芯片将样本纯化、核酸扩增、荧光检测集于一体, 能够有效避免实验过程中的交叉污染^[1]。Zhao 等^[19]设计了一款离心式 LAMP 微流控芯片用以检测不同型别的人乳头瘤病毒, 以树脂颗粒吸附样本中的杂质, 能简单、高效对原始样本进行核酸纯化, 再利用离心力完成样本混匀、扩增的过程并由荧光检测装置直接获取结果, 是一种快速、准确、自动化的实验室外 HPV 检测方法。

2.3 依赖核酸序列的扩增技术 依赖核酸序列的扩增技术 (nucleic acid sequence-based amplification, NASBA) 是针对 RNA 的特异性等温扩增方法, 此方法主要依赖噬菌体 T7 RNA 多聚酶、AMV 逆转录酶、核酸酶 H、特异性引物等共同完成, 可以在微量样本中准确检测出多种病原体^[20-22]。NASBA 技术结合化学发光法进行分析的一种新策略, Karasawa 等^[23]提出一种通过测定 NASBA 扩增过程中产生的焦磷酸, 间接检测 miRNA-196a 的新方法, 灵敏度可达 1 ng/反应, 同时具有低成本, 结构紧凑等优点, 对于核酸 POCT 检测发展具有重要的意义。然而, NASBA 扩增技术也存在一定的局限性, 其反应成分复杂, 需要多种酶相互协同, 并且不适用于 DNA 的检测^[24]。

2.4 滚环扩增技术 滚环扩增 (rolling circle amplification, RCA) 是以环状核酸为模板, 线性模板通过锁环探针 (padlock probe) 的帮助, 在 DNA 聚合酶作用下合成重复线性单链 DNA 的扩增方法, 可以与化学发光、电化学、荧光技术结

合成为高灵敏的核酸检测方法^[25-27]。得益于扩增的高效性和高灵敏度, RCA 常被用于 miRNA 的检测, Liu 等^[28]设计了一款荧光纸基分析装置 (PADs) 用于胃癌相关生物学标志物——miRNA-21 和 circRNA-HIAT1 的筛查。该作者将特异性引物固定于处理后的纤维素纸上, 靶序列与引物结合后启动 RCA 产生长链 DNA, 同时标记有荧光基团的探针与扩增产物结合, 从而使纸基颜色发生变化。PADs 具有出色的抗干扰能力, 在胃癌筛查和核酸 POCT 检测方面具有较高的潜力。虽然 RCA 技术的扩增效率高, 锁环探针也提高了扩增特异性, 但仍需要模板为单链环状结构, 在模板浓度低时, 结合效率随之降低, 检测灵敏度难以保证^[29]。

2.5 链置换扩增技术及杂交链式反应 链置换扩增技术 (strand displacement amplification, SDA) 中的 DNA 酶切位点经限制性核酸内切酶切割后在 DNA 聚合酶作用下继续延伸, 并将下游 DNA 片段置换出来^[30]。而杂交链式反应 (hybridization chain reaction, HCR) 是一种无酶等温放大技术, 当靶标存在时, 2 个稳定的发夹结构被交叉打开, 继而交替杂交形成双链 DNA 直至发夹结构耗尽, 具有灵敏度高、扩增效率高、结构灵活的优点, 但在扩增过程中可能存在明显的非特异性反应^[31]。Miao 等^[32]将 SDA 与 HCR 相结合用于检测外泌体 miRNA, 靶序列激活 SDA 反应产生大量单链 DNA, 产物与固定于电极表面的特异性核苷酸序列结合后引起发夹结构变化并重复堆叠, 最后根据电化学信号变化计算血浆中 miRNA 的含量, 是一种可以应用于癌症快速诊断的高效、灵敏的方法。

3 无需扩增的核酸检测技术

近年来, CRISPR 及 CRISPR 相关蛋白 (Cas) 系统的研究和应用取得了巨大的成就, 不仅是基因编辑的强大工具, 同时也可作为序列特异性靶向和检测的有效手段^[33]。CRISPR 系统用于核酸检测的原理是通过 CRISPR-derived RNA (crRNA) 与 Cas12 或 Cas13 蛋白形成的复合物, 与靶标序列结合后, Cas 蛋白的旁路切割活性激活, 非特异性切割报告探针, 最后通过荧光信号或层析试纸观察检测结果^[34]。CRISPR 系统与核酸扩增技术结合可以放大检测信号, 使超高灵敏、高特异性、快速的核酸 POCT 检测成为可能^[35], 目前已经有大量关于 CRISPR 联合各种扩增技术实现高灵敏度检测的报道^[36-38]。虽然单独使用 Cas 蛋白进行核酸检测的灵敏度较低, 但可以通过使用多个 crRNA 增加 Cas13a 蛋白的激活, 从而提高检测敏感性, 达到无需扩增直接检测核酸的目的。Fozouni 等^[39]筛选出 2 个 crRNA 组合用于新型冠状病毒检测, 能够在 30 min 内检测出 100 copies/ μL 的病毒 RNA。使用针对不同区域设计的 crRNA 可以有效防止病毒突变而导致的假阴性结果, 并且可以根据不同需求, 通过改变反应时间, 选择更优的 crRNA 组合来调节灵敏度, 能够应用于多种场景下的核酸 POCT 检测。此外, Heo 等^[40]提出通过增加检测传感器的敏感性来检测 Cas13a 切割 RNA 时产生的电流变化, 从而实现直接检测。电极经纳米复合材料修饰后具有更高的电导率, 当 Cas13a 蛋白被激活后, 可以对固定于电极表面的报告探针进行非特异性切割, 导致

电极表面峰值电流产生变化来定量 RNA。这种电化学生物传感器可以从唾液样本中检测出低至 4.4×10^{-2} fg/mL 的新型冠状病毒,实现了无扩增检测超低浓度 RNA,是一种具有高度敏感性和分析性能的核酸检测新平台。

4 核酸 POCT 检测技术的展望及挑战

现代分子诊断技术如 RPA、LAMP、NASBA、CRISPR 等,以及新型光、电化学材料,如金属纳米颗粒、化学发光材料、分子信标、碳基材料等,这些技术和材料的结合提高了核酸检测的能力,势必会带动核酸 POCT 技术向更灵敏、更简单、更迅速的方向发展,并且实现检测结果从定性到定量的转变。尤其是微流控芯片技术,作为一种可以将样本前处理、扩增和检测等步骤集于一体的新型技术平台,不仅简化了操作步骤,减少了人为干预,提高了可重复性,同时还具有实现高通量和多靶点自动化检测的潜力^[41],为快速、准确地诊断疾病提供支持。随着核酸分离技术、微泵装置和温控系统等技术的进步,微流控芯片会继续向小型、高集成度、低成本的方向发展。

在核酸 POCT 检测技术迅猛发展的同时,智能手机和人工智能为核酸 POCT 检测提供了更加高效和智能化的解决方案。智能手机的计算能力和云端技术可用于核酸扩增和分析,高分辨率摄像头能够拍摄反应管或芯片图像,并通过图像处理和分析算法识别相应的信号,最后通过无线网络将检测数据传输到云端服务器进行分析和存储。此时,人工智能可对采集到的数据和图像进行分析处理,并生成数字化结果,从而减少了分析时间和检测结果的主观性^[34]。智能手机和人工智能在核酸 POCT 检测领域的应用能够实现实时监测、预测和诊断支持,推动远程医疗和个性化治疗的实现。

近年来,尤其在新冠疫情暴发后,已有多种核酸恒温扩增仪上市,例如基于微流控芯片技术的恒温扩增仪(上海速创 MA3000)、基于 LAMP 技术的便携式扩增仪(长光辰英 Home Lab)、基于 RPA 的等温扩增仪(江苏奇天 F1620)等。但核酸 POCT 检测装置全面投入临床仍面临一些挑战:第一,由于 POCT 检测装置本身的复杂性,设备的研发和制造需要高水平的技术和质量控制,确保设备的可靠性及经济性;第二,核酸 POCT 检测需要有规范的标准和质量控制措施,以确保结果的准确性和可比性。此外,还需要获得相关机构的认可和批准,才能在临床实践中广泛应用。

综上所述,核酸 POCT 检测技术正处于蓬勃发展的阶段,借助人工智能的引入,为快速、准确、便携的诊断提供了新的解决方案。可以预见,核酸 POCT 检测势必会在传染病控制、远程诊断和个性化医疗等领域发挥重要作用,为人们的健康管理和疾病预防带来巨大的帮助。

5 参考文献

[1] Xiao M, Tian F, Liu X, et al. Virus detection: from state-of-the-art laboratories to smartphone-based point-of-care testing[J]. Adv Sci, 2022, 9(17):e2105904.
[2] Jiang X, Loeb JC, Manzanos C, et al. Valve-enabled sample preparation and RNA amplification in a coffee mug for zika virus detection

[J]. Angew Chem Int Ed Engl, 2018, 57(52):17211-17214.
[3] Phillips EA, Moehling TJ, Ejendal KFK, et al. Microfluidic rapid and autonomous analytical device (microRAAD) to detect HIV from whole blood samples[J]. Lab Chip, 2019, 19(20):3375-3386.
[4] Oh SJ, Park BH, Choi G, et al. Fully automated and colorimetric foodborne pathogen detection on an integrated centrifugal microfluidic device[J]. Lab Chip, 2016, 16(10):1917-1926.
[5] Miralles V, Huerre A, Malloggi F, et al. A review of heating and temperature control in microfluidic systems: techniques and applications[J]. Diagnostics, 2013, 3(1):33-67.
[6] Daher RK, Stewart G, Boissinot M, et al. Recombinase polymerase amplification for diagnostic applications[J]. Clin Chem, 2016, 62(7):947-958.
[7] Xu JH, Kang L, Yuan B, et al. Development and evaluation of a rapid RPA/CRISPR-based detection of *Francisella tularensis* [J]. Front Microbiol, 2022, 13:901520.
[8] Wang JC, Wang JF, Li RW, et al. Rapid and sensitive detection of canine distemper virus by real-time reverse transcription recombinase polymerase amplification[J]. BMC Vet Res, 2017, 13(1):241.
[9] Zhao LW, Wang JC, Sun XX, et al. Development and evaluation of the rapid and sensitive RPA assays for specific detection of *Salmonella* spp. in food samples[J]. Front Cell Infect Microbiol, 2021, 11:631921.
[10] Deng WP, Wang SL, Wang LP, et al. Laboratory evaluation of a basic recombinase polymerase amplification (RPA) assay for early detection of *Schistosoma japonicum*[J]. Pathogens, 2022, 11(3):319.
[11] 陈杉, 马雪萍, 谢春梅, 等. 乙型肝炎病毒重组酶聚合酶等温扩增闭环可视化检测方法及其装置[J]. 医学研究生学报, 2020, 33(5):515-520.
[12] Gootenberg JS, Abudayeh OO, Lee JW, et al. Nucleic acid detection with CRISPR-Cas13a/C2c2[J]. Science, 2017, 356(6336):438-442.
[13] Arizti-Sanz J, Freije CA, Stanton AC, et al. Streamlined inactivation, amplification, and Cas13-based detection of SARS-CoV-2 [J]. Nat Commun, 2020, 11:5921.
[14] Li Z, Liu Y, Wei QQ, et al. Picoliter well array chip-based digital recombinase polymerase amplification for absolute quantification of nucleic acids[J]. PLoS One, 2016, 11(4):e0153359.
[15] Munawar MA. Critical insight into recombinase polymerase amplification technology[J]. Expert Rev Mol Diagn, 2022, 22(7):725-737.
[16] 李美, 陈飘飘, 应斌武. 基于环介导等温扩增技术的即时检测在检验医学中的应用[J]. 中华检验医学杂志, 2021, 44(9):776-780.
[17] Reuter C, Slesiona N, Hentschel S, et al. Loop-mediated amplification as promising on-site detection approach for *Legionella pneumophila* and *Legionella* spp[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2020, 104(1):405-415.
[18] Joung J, Ladha A, Saito M, et al. Point-of-care testing for COVID-19 using SHERLOCK diagnostics[J]. medRxiv, 2020:2020.05.04.20091231.
[19] Zhao XY, Li X, Yang WH, et al. An integrated microfluidic detection system for the automated and rapid diagnosis of high-risk hu-

- man papillomavirus[J]. *Analyst*, 2021, 146(16):5102-5114.
- [20] Zhai LG, Liu HX, Li JJ, *et al.* A duplex real-time NASBA assay targeting a serotype-specific gene for rapid detection of viable *Salmonella* Paratyphi C in retail foods of animal origin[J]. *Can J Microbiol*, 2022, 68(4):259-268.
- [21] Clancy E, Coughlan H, Higgins O, *et al.* Development of internally controlled duplex real-time NASBA diagnostics assays for the detection of microorganisms associated with bacterial meningitis[J]. *J Microbiol Methods*, 2016, 127:197-202.
- [22] Zhou DN, Wang SS, Yang KL, *et al.* Rapid and simultaneous detection of Japanese encephalitis virus by real-time nucleic acid sequence-based amplification[J]. *Microb Pathog*, 2021, 150:104724.
- [23] Karasawa K, Arakawa H. Detection of micro-RNA by a combination of nucleic acid sequence-based amplification and a novel chemiluminescent pyrophosphate assay[J]. *Luminescence*, 2022, 37(5):822-827.
- [24] Hønsvall BK, Robertson LJ. From research lab to standard environmental analysis tool: will NASBA make the leap? [J]. *Water Res*, 2017, 109:389-397.
- [25] Chen SY, Zhao JJ, Xu CH, *et al.* Absolute quantification of microRNAs in a single cell with chemiluminescence detection based on rolling circle amplification on a microchip platform[J]. *Anal Chem*, 2021, 93(26):9218-9225.
- [26] Gu LD, Yan WL, Liu L, *et al.* Research progress on rolling circle amplification (RCA)-based biomedical sensing[J]. *Pharmaceuticals*, 2018, 11(2):35.
- [27] Ye Y, Lin Y, Chi ZL, *et al.* Rolling circle amplification (RCA)-based biosensor system for the fluorescent detection of miR-129-2-3p miRNA[J]. *PeerJ*, 2022, 10:e14257.
- [28] Liu YQ, Li RY, Liang FY, *et al.* Fluorescent paper-based analytical devices for ultra-sensitive dual-type RNA detections and accurate gastric cancer screening[J]. *Biosens Bioelectron*, 2022, 197:113781.
- [29] Gao YP, Huang KJ, Wang FT, *et al.* Recent advances in biological detection with rolling circle amplification: design strategy, biosensing mechanism, and practical applications[J]. *Analyst*, 2022, 147(15):3396-3414.
- [30] Walker GT, Fraiser MS, Schram JL, *et al.* Strand displacement amplification: an isothermal, *in vitro* DNA amplification technique [J]. *Nucleic Acids Res*, 1992, 20(7):1691-1696.
- [31] Bi S, Yue SZ, Zhang SS. Hybridization chain reaction: a versatile molecular tool for biosensing, bioimaging, and biomedicine [J]. *Chem Soc Rev*, 2017, 46(14):4281-4298.
- [32] Miao P, Tang YG. Dumbbell hybridization chain reaction based electrochemical biosensor for ultrasensitive detection of exosomal miRNA[J]. *Anal Chem*, 2020, 92(17):12026-12032.
- [33] Hajian R, Balderston S, Tran T, *et al.* Detection of unamplified target genes via CRISPR-Cas9 immobilized on a graphene field-effect transistor[J]. *Nat Biomed Eng*, 2019, 3(6):427-437.
- [34] 孙雯君, 黄行许, 王鑫杰. 基于 CRISPR 的快速灵敏便捷分子检测[J]. *生物工程学报*, 2023, 39(1):60-73.
- [35] Chu HW, Liu CH, Liu JS, *et al.* Recent advances and challenges of biosensing in point-of-care molecular diagnosis[J]. *Sens Actuators B Chem*, 2021, 348:130708.
- [36] Gao DS, Zhu XD, Lu BF. Development and application of sensitive, specific, and rapid CRISPR-Cas13-based diagnosis [J]. *J Med Virol*, 2021, 93(7):4198-4204.
- [37] Yang B, Shi ZW, Ma Y, *et al.* LAMP assay coupled with CRISPR/Cas12a system for portable detection of African swine fever virus[J]. *Transbound Emerg Dis*, 2022, 69(4):e216-e223.
- [38] Teng F, Guo L, Cui TT, *et al.* CDetection: CRISPR-Cas12b-based DNA detection with sub-attomolar sensitivity and single-base specificity[J]. *Genome Biol*, 2019, 20(1):132.
- [39] Fozouni P, Son S, de León Derby MD, *et al.* Amplification-free detection of SARS-CoV-2 with CRISPR-Cas13a and mobile phone microscopy[J]. *Cell*, 2021, 184(2):323-333.e9.
- [40] Heo W, Lee K, Park S, *et al.* Electrochemical biosensor for nucleic acid amplification-free and sensitive detection of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) RNA via CRISPR/Cas13a trans-cleavage reaction[J]. *Biosens Bioelectron*, 2022, 201:113960.
- [41] 涂芸萍, 杨殿龙, 张中平, 等. 基于微流控芯片的等温扩增技术[J]. *生物工程学报*, 2022, 38(3):943-960.

(收稿日期:2023-09-14)

(本文编辑:许晓蒙)