

# miR-155 在胶质瘤干细胞样细胞的表达及临床意义

王瑞彤, 闫昕, 陈辉, 赵明明, 王淑为, 刘爽, 尹丰

**【摘要】** 目的 研究 miR-155 在人胶质瘤干细胞样细胞(glioblastoma stem-like cells, GSCs)与正常神经干细胞(neural stem cells, NSCs), 及不同病理级别脑胶质瘤组织的表达差异, 其表达水平与胶质瘤恶性程度及预后的关系。方法 采用神经球(neurosphere)培养法体外分离扩增人 GSCs 与 NSCs, 并进行免疫荧光及移植瘤实验鉴定。用 qRT-PCR 的方法检测 miR-155 在 GSCs、NSCs 及不同级别胶质瘤和正常脑组织的表达水平。结合患者的预后, 进行 Kaplan-Meier 生存曲线分析。结果 GSCs 的 miR-155 表达水平明显高于 NSCs ( $P < 0.05$ ); 随着胶质瘤级别的增高, miR-155 的表达水平也明显增高, WHO III 级、IV 级恶性胶质瘤的 miR-155 表达水平明显高于正常脑组织(均  $P < 0.05$ )。miR-155 高表达与恶性胶质瘤的不良预后密切相关。结论 miR-155 在 GSCs 及高级别胶质瘤组织中的表达水平增高, 其表达水平可作为判定胶质瘤预后的标志物。

**【关键词】** miR-155; 胶质瘤; 胶质瘤干细胞样细胞; 神经干细胞; 预后

**【中图分类号】** R739.41 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1672-7770(2019)04-0277-05

**The expression of miR-155 in GSCs and its clinical significance** WANG Rui-tong, YAN Xin, CHEN Hui, et al. Department of Neurology, Aerospace Center Hospital, Beijing 100039, China  
Corresponding author: YIN Feng

**Abstract: Objective** To study the different expression of miR-155 in glioblastoma stem-like cells(GSCs), neural stem cells(NSCs) and different grades glioma. To clarify the relationship of miR-155 expression, degree of malignancy and prognosis of glioma patients. **Methods** GSCs and NSCs were isolated in vitro using neurosphere culture, then characteristics of the GSCs and NSCs were identified by experiments of immunofluorescence and xenograft. QRT PCR technology was used to detect the expression levels of miR-155 in GSCs, NSCs, gliomas of different grades and normal brain tissues. Kaplan-meier survival curve analysis was performed in combination with patient prognosis. **Results** The expression of miR-155 increased significantly in GSCs compared with NSCs ( $P < 0.05$ ), and also increased with the malignant degree of glioma. The expression level of miR-155 in malignant glioma (WHO III, IV) was obviously higher than that of normal brain tissue (all  $P < 0.05$ ). The high expression of miR-155 was closely related to the poor prognosis of glioma. **Conclusion** The expression of miR-155 elevates in GSCs and malignant glioma specimens, and can be considered as biomarker for diagnosis and prognosis judgment of glioma.

**Key words:** miR-155; glioblastoma; glioblastoma stem-like cells; neural stem cells; prognosis of glioma

胶质瘤是最常见的原发性脑肿瘤, 每年每 10 万人中就有 5 ~ 10 人发病。按照世界卫生组织(WHO)的分类标准, 胶质瘤分为 4 类, 其中多形性胶质母细胞瘤(glioblastoma multiforme, GBM)的恶

性级别最高, 平均生存期为 14.6 个月。GBM 高度的复发性, 是对其进行有效治疗所面临的巨大挑战。因此, 在早期阶段获取相关的肿瘤发生发展及预后指标具有非常重要的意义。近年来许多研究显示, 胶质瘤特别是恶性胶质瘤中存在一小部分具有干细胞特征的细胞亚群, 称为胶质瘤干细胞样细胞(glioblastoma stem-like cells, GSCs)。目前有研究认

基金项目: 国家自然科学基金(81172384)

作者单位: 100039 北京, 航天中心医院神经内科(王瑞彤), 神经外科(闫昕, 陈辉, 尹丰); 海军总医院神经外科(赵明明, 王淑为, 刘爽)

通信作者: 尹丰

为, GSCs 起源于突变的神经干细胞 (neural stem cells, NSCs), 是脑肿瘤的起源细胞和产生放疗抵抗的主要原因<sup>[1]</sup>。深入研究 GSCs 与正常 NSCs 的分子遗传学特征差异, 对于进一步明确 GSCs 的恶性转化机制, 寻找针对恶性胶质瘤发生及复发的特异性治疗靶点具有至关重要的意义。近期发现的 MicroRNAs (miRNAs) 已经被证明是肿瘤发生发展关键信号路径的重要调节因子; 不同于 siRNA, miRNA 能够通过不严格的序列互补调节多重靶基因的表达及功能。因此, 以 miRNAs-靶基因为核心的调控网络的研究及构建, 对于全面了解肿瘤发病机制、寻找更有效的肿瘤分子治疗靶点具有重要意义。miRNAs 是短的非编码单股 RNAs, 由 17 ~ 22 个核苷酸组成, 通过与动物靶 mRNA 的 3' 非编码端 (untranslated regions, UTRs) 的相互作用, 参与 mRNA 转录后的降解并抑制 mRNA 的翻译, 是在转录后水平影响肿瘤发生发展的重要调控因子。已有研究发现, 作为致癌 miRNAs 的成员, miR-155 参与了淋巴瘤、乳腺癌、结肠癌、肺癌的发生, 其在转化生长因子- $\beta$  (transforming growth factor- $\beta$ , TGF- $\beta$ ) 介导的上皮间质转化 (epithelial-mesenchymal transition, EMT), 以及通过 RhoA 介导的细胞迁移和侵袭中也起着非常重要的作用<sup>[2-3]</sup>。部分实验研究结果显示, miR-155 过表达与肿瘤细胞的恶性增殖、低凋亡和高侵袭性密切相关。目前也有研究报道, miR-155 过表达能够促进胶质瘤的恶性进展<sup>[4]</sup>。但迄今为止, 对于 miR-155 在 GSCs 中的表达及其与胶质瘤预后的关系还未见报道。为了进一步明确 miR-155 在胶质瘤起源及恶性转化过程中的作用, 本研究采用 qRT-PCR 的方法检测 GSCs 与 NSCs 中 miR-155 的表达; 同时以正常脑组织为对照, 检测不同级别胶质瘤的 miR-155 表达水平; 并结合患者的预后, 对恶性胶质瘤 (WHO III 级和 IV 级) 患者进行生存曲线分析。旨在探讨 miR-155 在 GSCs 中的表达水平及对恶性胶质瘤预后的影响, 为寻找针对 GSCs 的特异性治疗靶点提供线索和实验依据。

## 1 材料与方法

1.1 材料 GSCs 来源于来自海军总医院神经外科手术切除的 GBM 患者的肿瘤组织。NSCs 取自 10 ~ 12 周龄人类自然流产胚胎的脑纹状体组织。本研究所采用标本的获取均经患者本人同意, 患者了解所取标本的风险和用途, 并签署知情同意书, 采用标本所从事的项目研究已由海军总医院伦理委员会论证通过。D/F12 培养基、胎牛血清和胰酶购自美国

Gibco 公司; hEGF、hb-FGF 购自美国 Shenandoah Biotechnology 公司; 鼠抗人分化抗原簇蛋白 133 (cluster of differentiation 133, CD133) 单克隆抗体购自美国 Miltenyi Biotec 公司; 兔抗人巢蛋白 (Nestin) 多克隆抗体、鼠抗人  $\beta$ -微管蛋白 ( $\beta$ -Tubulin) 单克隆抗体和兔抗人胶质纤维酸性蛋白 (glial fibrillary acidic protein, GFAP) 多克隆抗体购自美国 DAKO 公司; 免疫荧光染色相应的二抗均购自 Sigma 公司; Transwell 细胞培养板购自美国 Corning 公司; 动物立体定向仪为日本 SR-6R 型脑立体定位仪 (大鼠); 实时荧光定量通用试剂 (Ca#GMRS-001 吉玛, 上海); MX3000P 实时荧光定量 PCR 仪 (Stratagene, US)。

## 1.2 方法

1.2.1 人 GSCs 和 NSCs 的分离培养及鉴定 GSCs 和 NSCs 用 Neurosphere 方法体外培养扩增, 在稳定传代的基础上, 对这两种干细胞的表型特征和分化特性进行 CD133 和 Nestin 免疫化学染色鉴定; 同时在裸鼠颅内进行定向移植, 实验检测两种干细胞的体内成瘤性<sup>[5]</sup>。

1.2.2 GSCs 和 NSCs 的 miR-155 表达水平检测 采用 qRT-PCR 法检测。设计合成 miR-155 的 qRT-PCR 引物见表 1。采用实时荧光定量通用试剂, MX3000P 实时荧光定量 PCR 仪, 对体外培养鉴定后的 GSCs 和 NSCs 进行 miR-155 表达水平定量检测, 并绘制统计分析图。

表 1 引物设计

基因	序列	
hU6	U6-FO	ATTGGAACGATACAGAGAAGATT
	U6-RE	GGAACGCTTCACGAATTTG
	Size: 70 bp	
hsa-miR-155	Hsa-miR-155-FO	GCTTCGGTTAATGCTAATCGTG
	Hsa-miR-155-RE	AGACGAGGCTCCGAGCTA
	Size: 69 bp	

1.2.3 抑制 miR-155 表达后的 GSCs 增殖检测 设计合成 miR-155 inhibitor 和空白载体 (inhibitor NC) 分别转染 GSCs。用 CCK-8 试剂盒 (cell counting kit-8, CCK-8; DOJINDO, CK04) 配制 CCK-8 实验工作液, 每孔加入 100  $\mu$ L, 37  $^{\circ}$ C 孵育 1 h, 测定 450 nm 处吸光度。GSCs 分为转染 miR-155 inhibitor 组和 inhibitor NC 组, 每组设 3 个平行孔, 检测结果取平均值。

1.2.4 脑胶质瘤和正常脑组织标本收集 手术切除的脑胶质瘤标本 60 例 [其中 WHO II 级、III 级和 IV 级 (GBM) 患者各 20 例]; 20 例癫痫患者手术切除的正

常脑组织(正常对照);取得组织标本后均快速放入液氮保存待测。胶质瘤患者的平均年龄为 55.2 岁,癫痫患者的平均年龄为 48.3 岁。脑胶质瘤患者术前没有经过放化疗治疗。胶质瘤标本均来自于神经外科 2000 年—2008 年期间临床胶质瘤手术切除标本。

**1.2.5 不同级别胶质瘤和正常脑组织的 miR-155 表达水平检测** 从液氮取出胶质瘤及正常脑组织标本,用 Trizol (Invitrogen) 试剂迅速提取总 RNA。然后用 qRT-PCR 法定量检测不同级别胶质瘤和正常脑组织的 miR-155 表达水平。取各检测标本 150 ng 总 RNA,应用 qScript microRNA cDNA Synthesis 试剂盒(Quanta BioSciences, MD)反转录成 cDNA,然后用 PerfeCTa SYBR Green SuperMix(Quanta BioSciences, MS = D)进行 qRT-PCR,所有反应重复 3 次。miR-155 的相对表达水平用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  的方法计算。

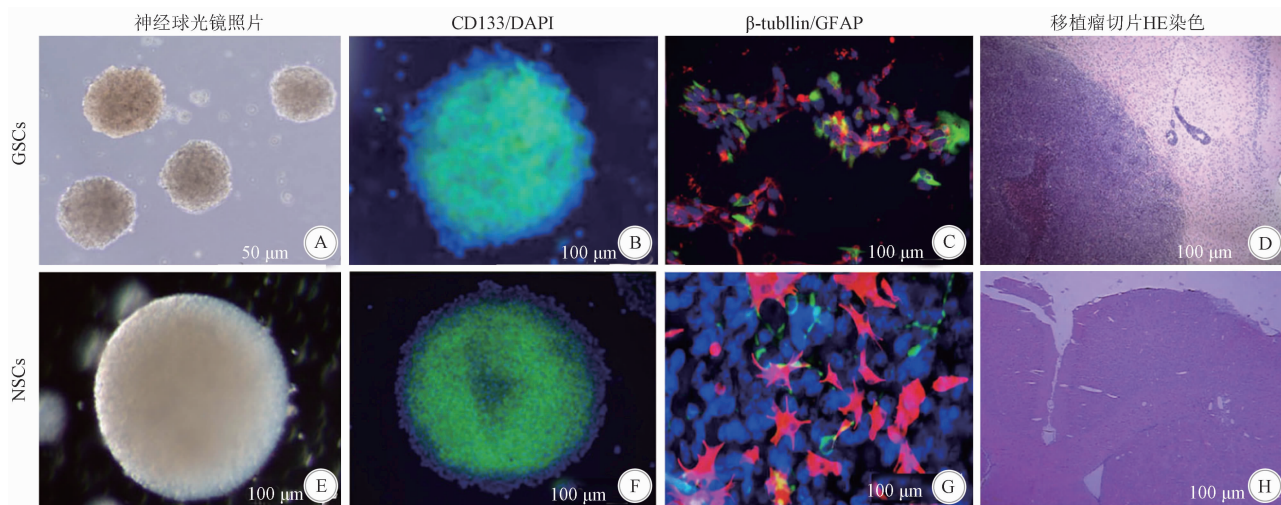
**1.2.6 胶质瘤患者预后的观察分析** 对 20 例胶质

瘤 IV 级患者进行严格的跟踪随访,并进行生存期统计。并结合患者的生存期与肿瘤组织的 miR-155 表达水平绘制 Kaplan-meier 生存曲线。

**1.3 统计学方法** 采用 SPSS16.0 统计软件进行数据处理分析。所检测数据以均数 ± 标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示,两组均数间比较用 Student's *t* 检验,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 GBM 来源的 GSCs 鉴定及移植** 无菌环境中分离 GBM 标本成单细胞悬液,无血清神经干细胞培养基体外培养 7 d,镜下可见许多小的神经球;免疫荧光染色显示 CD133 阳性。诱导分化后可形成 GFAP 阳性的神经胶质细胞和  $\beta$ -tubllin 阳性的神经元。用动物立体定向仪将这些神经球移植到裸鼠颅内,形成新的脑肿瘤(图 1)。



A:GBM 来源的 GSCs 体外培养 7 d 后,倒置显微镜下的神经球; B:GSCs 神经球的 CD133 免疫荧光染色; C:GSCs 神经球分化后 GFAP(红色)和  $\beta$ -tubllin(绿色)免疫荧光染色; D:GSCs 颅内移植瘤冰冻切片,可见新的肿瘤样组织形成(HE 染色); E: NSCs 体外培养 7 d 后,倒置显微镜下的神经球; F: NSCs 神经球的 CD133 免疫荧光染色; G: NSCs 神经球分化后 GFAP(红色)和  $\beta$ -tubllin(绿色)免疫荧光染色; H: NSCs 颅内移植瘤冰冻切片,未见肿瘤样组织形成(HE 染色)

图 1 GSCs 与 NSCs 体外培养、鉴定及颅内移植

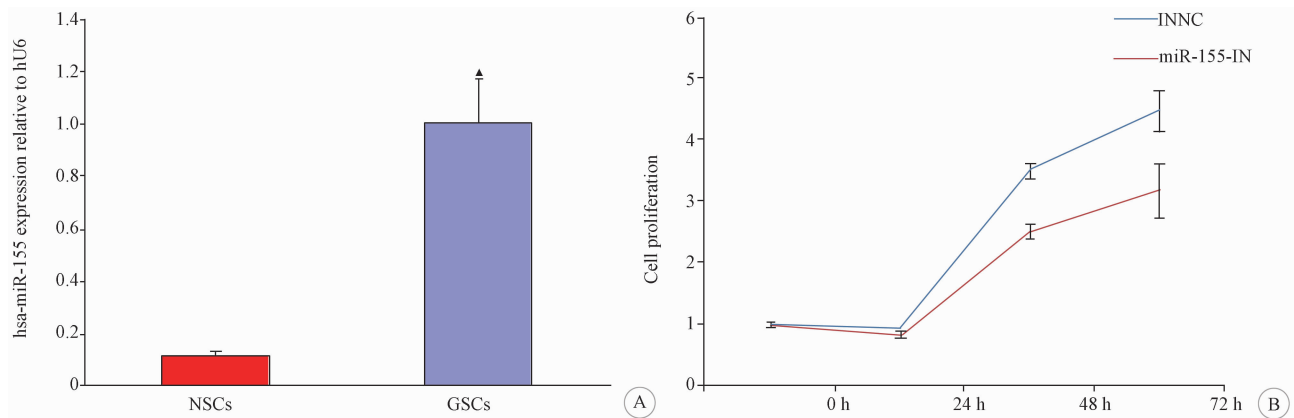
**2.2 GSCs 与 NSCs 的 miR-155 表达水平比较** 与 NSCs 相比,GSCs 的 miR-155 表达水平明显升高,差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ) (图 2A)。结果提示 miR-155 可能参与了 NSCs 向 GSCs 的恶性转化及胶质瘤的发生。

**2.3 抑制 miR-155 表达对 GSCs 增殖的影响** CCK-8 实验结果显示,miR-155 inhibitor 转染的 GSCs 的增殖能力较转染 inhibitor NC 的 GSCs 明显降低,转染 24 h 后降低趋势更明显(图 2B)。

**2.4 不同级别胶质瘤与正常脑组织的 miR-155 表达水平比较** 随着胶质瘤级别的增高,miR-155 的表达水平也明显增高(图 3);恶性胶质瘤(WHO III

级、IV 级)的 miR-155 表达水平明显高于正常脑组织(均  $P < 0.05$ )。提示 miR-155 与胶质瘤的恶性程度相关联。

**2.5 miR-155 表达对恶性胶质瘤患者预后的影响** 见图 4。20 例 WHO IV 级(GBM)患者的平均 miR-155 表达水平为 2.95。将高于平均 miR-155 表达水平值的患者设为 miR-155 高表达组,低于平均表达水平值的患者设为 miR-155 低表达组。分析结果显示,miR-155 高表达组患者的中位生存期为 0.76 年,而低表达组患者的中位生存期为 1.71 年;高表达组患者的生存时间明显短于低表达组 ( $P < 0.001$ )。



A: GSCs 与 NSCs 的 miR-155 表达水平比较 (与 NSCs 比较  $\Delta P < 0.05$ ); B: GSCs 分别转染 miR-155 inhibitor 和 inhibitor NC 后 0, 24, 48, 72 h 的细胞增殖能力 (CCK-8 实验的 OD450 nm 吸光度值)

图2 GSCs 与 NSCs 的 miR-155 表达水平及对 GSCs 增殖能力的影响

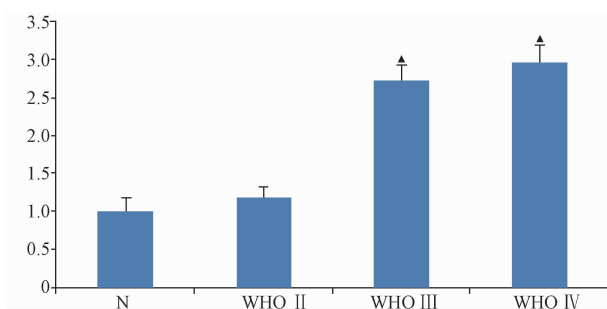


图3 不同级别胶质瘤与正常脑组织的 miR-155 表达水平比较 (与正常脑组织比较  $\Delta P < 0.05$ )

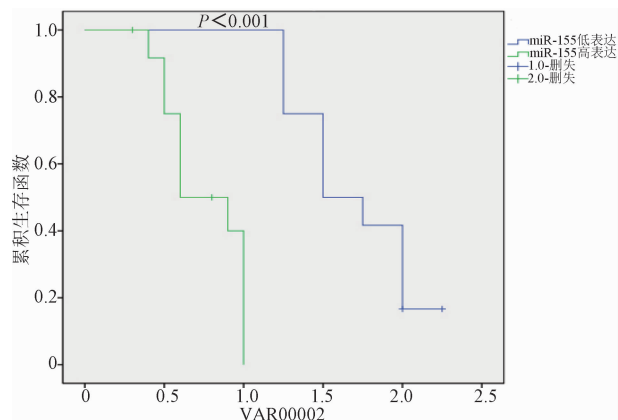


图4 Kaplan-Meier 生存曲线分析 miR-155 表达与 GBM 患者预后的关系

### 3 讨论

胶质瘤是最常见的脑肿瘤,由于其高度增殖和侵袭的特性,使其预后非常差。因此迫切需要对其发生发展的分子机制进行进一步的探索,寻找到关键靶基因和治疗靶点,从而提高对恶性脑胶质瘤的治疗效果。本课题组在前期研究工作中发现恶性胶质瘤,特别是复发的间变型胶质瘤和 GBM 中存在有高比例的 GSCs。目前许多研究认为 GSCs 可能起源于突变的 NSCs<sup>[6]</sup>,是 GBM 的起源细胞和产生放化

疗抵抗的主要原因,也是今后靶向治疗重要的靶细胞群。因此,对于导致这两种干细胞生物学特性差异的分子水平的深入研究无疑将为最终揭示 GSCs 的起源和恶性转化的分子机制,探索针对 GSCs 的靶向治疗的有效靶点提供重要线索。本课题组在前期研究发现,GSCs 与正常 NSCs 在 miRNA 芯片表达谱上存在明显差异,miR-155 在 GSCs 中的表达在上调 miRNA 的前 10 位<sup>[7]</sup>。因此,本研究进一步对比分析了 GSCs 与正常 NSCs 的 miR-155 表达水平差异;结果显示,GSCs 的 miR-155 表达水平明显高于正常 NSCs ( $P < 0.05$ )。而 GSCs 多存在于 III - IV 级恶性胶质瘤组织中,故推测 miR-155 的过表达参与了胶质瘤的恶性进展,并造成了恶性胶质瘤的不良预后。

有研究显示,表达不同 miRNA 的胶质瘤患者具有不同的预后和对治疗的不同反应;因此,miRNA 能够帮助胶质瘤患者分类、诊断及预测临床转归<sup>[8-11]</sup>。目前有许多研究报道,恶性胶质瘤与正常脑组织之间 miRNA 的表达差异,如 miR-21 和 miR-26a 在 GBM 组织中的表达水平较肿瘤周边正常脑组织明显升高,其可以通过靶向抑制抑癌基因 PTEN 的表达而促进肿瘤的恶性进展;这些致瘤 miRNAs 是肿瘤预后不良的标志<sup>[12]</sup>。另有研究显示,miR-124、miR-137 和 miR-451 在 GBM 中呈低表达<sup>[13]</sup>,而且在 GSCs 中的表达水平更低;在 GSCs 中过表达这些 miRNAs 能够抑制 GSCs 的增殖,促进 GSCs 的分化。颜光美等近期报道了 miR-135a 在恶性胶质瘤中异常低表达,并且与胶质瘤的恶性级别呈负相关。过表达 miR-135a 可以通过调节 STAT6、SMAD5 和 BMPR-II 等基因诱导胶质瘤细胞线粒体依赖的凋亡反应,且对正常神经细胞无影响<sup>[14]</sup>。这些研究结果提示,某些抑癌 miRNAs 可以作为特异性的治疗因子用于恶性胶质瘤的靶向治疗。因此,

对参与到胶质瘤发生发展中的 miRNAs 的检测及研究,以及在此基础上相应调控网络的构建对明确胶质瘤发生发展的分子机制、寻找判断胶质瘤预后的生物标志物及选择更有效的治疗靶点都具有至关重要的意义。

miR-155 定位于 21 号染色体,其已经被证明在许多肿瘤组织中高表达,并且对于肿瘤的恶性进展具有促进作用<sup>[14]</sup>。如 miR-155 过表达会导致 B 淋巴细胞的恶变<sup>[15]</sup>,miR-155 在肺癌中的高表达与其不良预后密切相关。miR-155 通过作用于不同的癌基因或抑癌基因而在肿瘤的发生发展中发挥作用。有研究发现,miR-155 在肝细胞癌中通过 PI3K/Akt 信号路径抑制 PTEN,从而促进肿瘤的侵袭和转移;而作为肿瘤促进因子,miR-155 在膀胱癌中能够直接降低抑癌基因 DMTF1 的表达<sup>[16]</sup>。近年来,miR-155 在胶质瘤的表达和作用也逐渐引起关注。有研究显示,miR-155 通过活化 Wnt 信号通路,促进胶质瘤的恶性进展<sup>[17]</sup>。但其在 GSCs 中的表达情况还未见报道。本研究采用 qRT-PCR 对 GSCs 与 NSCs 的 miR-155 表达水平进行检测,结果显示 GSCs 的 miR-155 表达水平较 NSCs 明显升高 ( $P < 0.05$ );提示 miR-155 可能参与了 GSCs 的起源,而其高表达很可能与胶质瘤的恶性进展和不良预后相关联。近年来,许多研究显示 miR-155 是多种肿瘤的预后判断因子<sup>[18]</sup>。本研究对不同级别胶质瘤组织与正常脑组织的 miR-155 表达水平进行了分析比较,结果显示恶性胶质瘤 (WHO III 级、IV 级) 的 miR-155 表达水平明显高于正常脑组织 (均  $P < 0.05$ ),并且随着胶质瘤级别的升高而明显增高 (图 3)。Kaplan-meier 生存曲线分析显示,miR-155 高表达组 GBM 患者的生存时间明显短于低表达组患者 ( $P < 0.001$ )。以上结果表明,miR-155 参与了 GSCs 及胶质瘤的发生和发展,可作为判断胶质瘤恶性程度及预后的分子标志物。Schliesser 等的研究显示,miR-155 启动子的甲基化和 miR-155 的表达密切相关<sup>[19]</sup>。在今后的研究中,可进一步探讨 miR-155 启动子甲基化与 miR-155 表达及胶质瘤患者预后的关系。

总之,本研究是在目前已有研究结果的基础上对胶质瘤的发生与恶性进展机制的进一步探索;为明确恶性胶质瘤的发生发展机制及寻找靶向治疗的有效靶点提供理论依据和实验支持。

#### [参 考 文 献]

[1] Kang MK, Kang SK. Tumorigenesis of chemotherapeutic drug-resistant cancer stem-like cells in brain glioma [J]. Stem Cells

- Dev,2007,16:837.
- [2] Lu J, Getz G, Miska EA, et al. MicroRNA expression profiles classify human cancers[J]. Nature,2005,435:834.
- [3] Volinia S, Calin GA, Liu CG, et al. A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets[J]. Proc Natl Acad Sci U S A,2006,103:2257.
- [4] D'urso PI, D'urso OF, Storelli C, et al. miR-155 is up-regulated in primary and secondary glioblastoma and promotes tumour growth by inhibiting GABA receptors[J]. Int J Oncol,2012,41:228.
- [5] 刘爽,张剑宁,尹丰,等. 神经干细胞对脑肿瘤干细胞体内外向性研究[J]. 中华神经外科杂志,2012,28:1172.
- [6] Quinones-Hinojosa A, Chaichana K. The human subventricular zone:A source of new cells and a potential source of brain tumors [J]. Exp Neurol,2007,205:313.
- [7] Liu S, Yin F, Zhang JN, et al. Regulatory roles of miRNA in the human neural stem cell transformation to glioma stem cells[J]. J Cell Biochem,2014,115:1368.
- [8] Parker NR, Correia N, Crossley BA, et al. Correlation of microRNA 132 up-regulation with an unfavorable clinical outcome in patients with primary glioblastoma multiforme treated with radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide chemotherapy[J]. Transl Oncol,2013,6:742.
- [9] Henriksen M, Johnsen KB, Olesen P, et al. MicroRNA expression signatures and their correlation with clinicopathological features in glioblastoma multiforme[J]. Neuromol,2014,16:565.
- [10] Malzkorn B, Wolter M, Liesenberg F, et al. Identification and functional characterization of microRNAs involved in the malignant progression of gliomas[J]. Brain Pathol,2010,20:539.
- [11] Low SY, Ho YK, Too HP, et al. MicroRNA as potential modulators in chemoresistant high-grade gliomas[J]. J Clin Neurosci,2014,21:395.
- [12] Conti A, Aguenouz MH, La Torre DA, et al. miR-21 and 221 upregulation and miR-181b downregulation in human grade II-IV astrocytic tumors[J]. J Neurooncol,2009,93:325.
- [13] Silber J, Lim DA, Petritsch C, et al. miR-124 and miR-137 inhibit proliferation of glioblastoma multiforme cells and induce differentiation of brain tumor stem cells[J]. BMC Med,2008,6:14.
- [14] Wu S, Lin Y, Xu D, et al. MiR-135a functions as a selective killer of malignant glioma[J]. Oncogene,2012,31:3866.
- [15] Peggy S, Wayne T, Liping S, et al. Accumulation of miR-155 and Bic RNA in human B cell lymphomas[J]. PNAS,2005,102:3627.
- [16] Fu X, Wen HQ, Jing L, et al. MicroRNA-155-5p promotes hepatocellular carcinoma progression by suppressing PTEN through the PI3K/Akt pathway[J]. Cancer Sci,2017,108:620.
- [17] Yan ZY, Che SS, Wang JP, et al. miR-155 contributes to the progression of glioma by enhancing Wnt/beta-catenin pathway[J]. Tumor Biol,2015,36:5323.
- [18] Fang H, Shuang D, Yi Z, et al. Up-regulated microRNA-155 expression is associated with poor prognosis in cervical cancer patients, Biomed[J]. Pharmacother,2016,83:64.
- [19] Schliesser MG, Claus R, Hielscher T, et al. Prognostic relevance of miRNA-155 methylation in anaplastic glioma [J]. Oncotarget, 2016,7:82028.

(收稿 2019-01-03 修回 2019-03-09)