

1例 RHD*weak D type 72 患者的血型鉴定及家系 RHD 基因序列分析

庄乃保, 吴凡, 张艳艳, 梁爽, 梁延连, 苏宇清, 彭龙 (深圳市血液中心, 广东深圳 518035)

摘要: **目的** 研究1例 RhD 血型鉴定部分凝集结果个体及其家系血清学表现和 RHD 基因。**方法** 通过血型微柱凝胶卡检测先证者 ABO 及 RhD 血型; 盐水试管法检测先证者及其父母 RhCcEe 抗原; 间接抗人球蛋白试验 (indirect anti-human globulin test, IAT) 及流式细胞术检测先证者 RhD 抗原。PCR 序列特异性引物 (PCR sequence specific primer, PCR-SSP) 检测 RHD 基因以及 RhD 杂合型分析, 基因测序方法分析 RHD 基因编码区序列。**结果** 血清学检测发现先证者血型为 A 型 RhCcee, 血型微柱凝胶卡、盐水试管法以及 IAT 法检测 RhD 抗原, 结果呈部分凝集现象。流式细胞术结果显示先证者 RhD 抗原性减弱。经 RHD 基因编码序列分析发现, RHD 基因第 9 外显子上的第 1212 位碱基发生 C > A 纯合突变, 为 RHD*weak D type 72 的特征性突变点。家系调查显示, 先证者父亲为 O 型 RhCCDee, 母亲为 A 型 RhCcDee。父亲携带 RHD*weak D type 72 等位基因, 基因型为 RHD*weak D type 72 / RHD+; 母亲一条染色体缺失了全部的 RHD 基因, 基因型为 RHD+ / RHD-。证明先证者分别从父亲和母亲遗传 RHD*weak D type 72 和 RHD- 等位基因, 基因型为 RHD*weak D type 72 / RHD-。**结论** 发现了 1 例 RHD*weak D type 72/RHD- 基因型个体, 丰富了 RHD*weak D type 72 变异型的研究数据。根据家系调查证明, RHD*weak D type 72 等位基因由遗传获得, 而非由个体基因变异形成。

关键词: Rh 血型; RhD 变异型; RHD 基因; 家系调查

中图分类号: R457.1 文献标识码: A 文章编号: 1671-7414 (2022) 04-149-05

doi:10.3969/j.issn.1671-7414.2022.04.029

Blood Group Identification and Family Investigation of a Patient with RHD*weak D Type 72 Allele

ZHUANG Nai-bao, WU Fan, ZHANG Yan-yan, LIANG Shuang, LIANG Yan-lian, SU Yu-qing, PENG Long

(Shenzhen Blood Center, Guangdong Shenzhen 518035, China)

Abstract: Objective To study the serological manifestations and RhD gene of an individual and his family with partial agglutination results of RhD blood group identification. **Methods** ABO and RhD blood groups of the proband were detected by microcolumn gelatin card. RhCcEe phenotypes of the proband and her parents were identified by serological test. Indirect anti-human globulin test (IAT) and flow cytometry were used to detect the RhD antigen of the proband. RHD genotype and RHD zygosity testing of the family were detected by PCR sequence specific primer (PCR-SSP). Also, the full length coding region of RHD gene was sequenced. **Results** The blood type serological testing of the proband presented as A, RhCcee. RhD blood group testing showed the result with mixed-field agglutination. Flow cytometry showed that the RhD antigenicity of the proband was decreased. RHD genotyping showed that the proband with a RHD c.1212 C > A mutation, which was the characteristic of RHD*weak D type 72. Pedigree investigation showed that the blood type of the proband's father was O, RhCCDee, and the blood type of the proband's mother was A, RhCcDee. The genotype of the father was RHD*weak D type 72/RHD+. The mother had a deletion of all the RHD genes on one chromosome, and the genotype of the mother was RHD+ / RHD-. The proband inherited RHD*weak D type 72 and RHD- alleles from the father and mother respectively. The genotype of the proband was RHD*weak D type 72/RHD-. **Conclusion** A case with the genotype of RHD*weak D type 72/RHD- was found. They conclude, as a complementary data, that the RHD*weak D type 72 allele was confirmed descend stably in this family.

Keywords: Rh blood group; RhD variant; RHD gene; pedigree investigation

Rh 血型系统是目前已发现的人类血型系统中具有很强的免疫原性, 是最重要的抗原。RhD 血型最复杂、最具多态性的血型系统, 其中 RhD 抗原不合可引起致命的溶血性输血反应和严重的新生儿

基金项目: 广东省医学科学技术研究基金项目 (A2020511); 深圳市医学重点学科建设经费资助 (SZXK070); 深圳市医疗卫生三名工程项目 (SZSM201811092)。

作者简介: 庄乃保 (1980-), 男, 本科, 副主任技师, 主要从事红细胞检测研究, 献血服务工作, E-mail: zgneighbor@126.com。

通讯作者: 吴凡 (1982-), 女, 硕士, 副主任技师, 主要从事红细胞、血小板相关检测、研究工作, E-mail: fancy_32fan@126.com, 共同第一作者。

溶血病^[1-2]。RhD抗原有很多变异型,包括弱D(Weak D)、部分D(Partial D)和D放散型(D-elute, DEL)。许多报告显示^[3-6],多种RhD变异型可引起RhD阴性受血者的免疫反应,RhD变异型个体也可被完整的RhD抗原免疫产生所缺乏的表位对应的抗体。RHD*weak D type 72等位基因于2007年在中国人人群中首次发现(GenBank登记号:EF103573),随后仅有个例报道^[7-10]。本文分析1例RHD*weak D type 72个体及其家系血清学表现和RHD基因,现将结果报道如下。

1 材料与方法

1.1 研究对象 患儿(先证者),女,汉族,4岁2个月,右颞顶部硬下血肿,无输血史。采集先证者及其父亲、母亲静脉血液5 ml置于EDTA抗凝管中,4℃保存。本研究经深圳市血液中心伦理委员会批准,文中所涉及患者及其家系均已被告知实验内容并由本人/监护人签署知情同意书。

1.2 仪器与试剂 ID-Incubator 37 SI保温箱, ID-Centrifuge 12 SII台式离心机(瑞士Diamed AG公司);KA-2200免疫血液学离心机(日本KUBOTA公司);BD FACSCantoTMII流式细胞仪(美国BD Bioscience公司);FL Auto显微镜细胞成像仪, ProFlex PCR System(美国Life technologies公司);MAXWELL 16 DNA提取仪(美国Promega公司);EP-1019电泳仪(美国Embitec公司);FluorChem R多功能成像分析系统(美国ProteinSimple公司)。

ABO血型正/反定型和RhD血型检测卡(其中抗-D单抗为LDM3/175-2)、样本稀释液和微柱凝胶低离子抗人球蛋白卡(美国Bio-rad公司);抗-C,抗-c,抗-E,抗-e单克隆IgM抗体血型定型试剂、抗-D单克隆IgG抗体(MS-26)、抗IgG,Cd3d抗人球蛋白检测试剂(上海血液生物公司);抗-D IgM+IgG血型定型试剂(175-2/D415 1E4)(加拿大Dominion公司);anti-D(TH-28/MS-26)(英国Millipore公司);荧光素FITC标记抗体羊抗人IgG(美国Jackson Immuno Research公司);DNA提取试剂盒(美国Promega公司);人类红细胞RhD基因分型试剂盒(天津市秀鹏公司)。

1.3 方法

1.3.1 ABO及Rh血型检测:采用ABO血型正/反定型和RhD血型检测卡检测先证者及其父母ABO和RhD血型;采用单克隆IgM抗体鉴定RhCcEe抗原。

1.3.2 先证者RhD抗原检测:采用三种不同生产厂家的抗-D定型试剂,使用试管间接抗球蛋白法

(IAT)和微柱凝胶卡抗人球蛋白法进一步检测先证者RhD抗原。显微镜观察试管IAT法凝集情况。

1.3.3 流式细胞术检测先证者RhD抗原:200 μg/ml的抗-D单克隆IgG抗体100 μl与1%样本红细胞生理盐水悬液50 μl混合于微孔板中,37℃孵育30 min。空白对照孔加生理盐水100 μl与1%洗涤O型RhD阳性红细胞悬液50 μl混合;阴性对照孔加200 μg/ml的抗-D单克隆IgG抗体100 μl与1%洗涤O型RhD阴性红细胞悬液50 μl混合;阳性对照孔加200 μg/ml的抗-D单克隆IgG抗体100 μl与1%洗涤O型RhD阳性红细胞悬液50 μl混合。生理盐水洗涤3次,加入10 μg/ml荧光素FITC标记抗体羊抗人IgG 100 μl/孔,37℃避光孵育30 min。生理盐水洗涤3次,最后一次洗涤后扣干,加生理盐水300 μl/孔稀释。流式细胞仪检测平均荧光强度。

1.3.4 基因组DNA提取、PCR扩增及RHD基因分型:取300 μl全血加入Blood DNA Purification Kit DNA提取试剂盒样本槽中,采用MAXWELL 16 DNA提取仪自动化提取全血DNA。每份DNA溶于300 μl DNA buffer。测定所提取的DNA浓度,低于2 ng/μl的DNA不能用于以下实验。使用人类红细胞RhD基因分型试剂盒,采用聚合酶链反应-序列特异性引物技术(PCR-SSP)进行PCR扩增。PCR扩增条件:96℃预变性2 min;然后96℃变性20 s,68℃退火1 min,循环5次;96℃变性20 s,65℃退火50 s,72℃延伸45 s,循环10次;96℃变性20 s,62℃退火50 s,72℃延伸45 s,循环18次;最后72℃延伸5 min,降温至4℃完成扩增。2.5g/dl的琼脂糖凝胶电泳分析扩增产物。

1.3.5 RhD杂合型分析:RHD基因的两端存在两个具有98.6%同源性的区域,即Rh盒子序列。当RHD基因全缺失时,两端Rh盒子融合为融合盒子。若样本可检出融合盒子,说明至少存在一条染色体RHD基因全缺失。根据此原理特异性扩增Rh融合盒子,判断先证者及其父母是否存在RHD基因的缺失,由天津秀鹏生物技术有限公司完成。

1.3.6 RHD基因编码区序列分析:测定RHD基因的10个外显子序列,将测序结果与参比序列Genebank BN000065进行比对。引物合成和测序均由天津秀鹏生物技术有限公司完成。

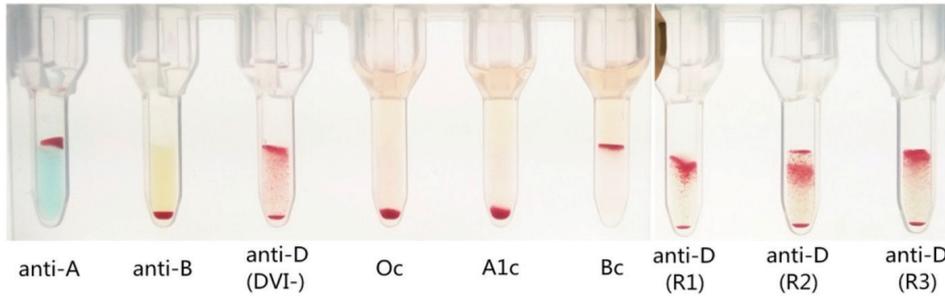
1.4 统计学分析 使用IBM SPSS Statistics 20.0统计软件分析平均荧光强度数据,计量数据采用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用t检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 血型血清学检测 见图1,图2。ABO血型

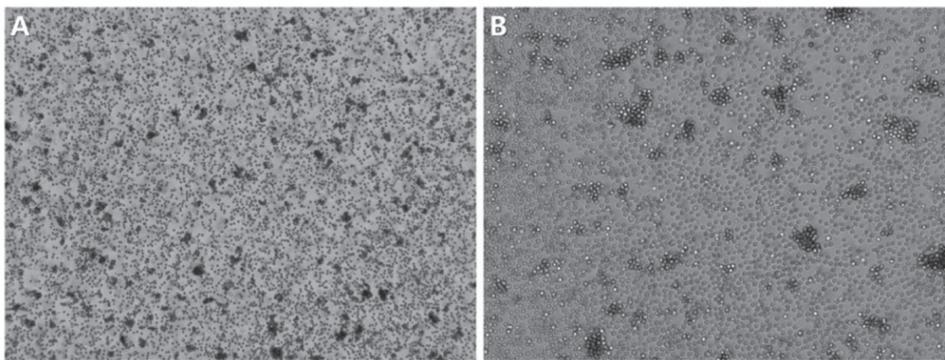
正 / 反定型和 RhD 血型检测卡显示先证者为 A 型 RhDCcee, 其母亲为 A 型 RhDCcee, 父亲为 O 型 RhDCcee。先证者 RhD 血型检测卡以及三种不同

生产厂家抗 -D 定型试剂微柱凝胶卡抗人球蛋白法结果均表现为部分凝集, 显微镜观察间接抗球蛋白法结果为混合视野外观。



R1: 英国 Millipore 公司 anti-D; R2: 加拿大 Dominion 公司抗 -D IgM+IgG 血型定型试剂; R3: 上海血液生物公司抗 -D 单克隆 IgG 抗体。

图 1 先证者 ABO 及 RhD 血型微柱凝胶卡检测结果



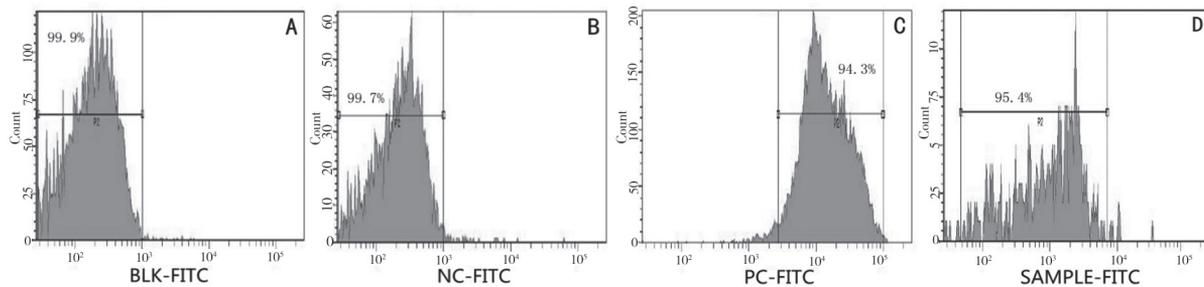
A. 10 ×

B. 20 ×

图 2 先证者 RhD 血型试管 IAT 法显微镜观察结果

2.2 流式细胞术检测先证者 RhD 抗原 见图 3。流式细胞术检测结果显示空白对照、阴性对照和阳性对照平均荧光强度分别为 159.0 ± 27.9 , 241.7 ± 15.6 , $19\ 380.3 \pm 160.2$ ($n=3$)。先证者 RhD 抗原平均荧光强度为 $1\ 247.0 \pm 217.2$ ($n=3$)，分

别与空白对照 ($t=9.320$, $P=0.011$)、阴性对照 ($t=8.416$, $P=0.014$) 和阳性对照 ($t=-86.170$, $P=0.000$) 相比, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$)。先证者 RhD 抗原性较阳性对照弱, 峰值左移; 且峰型变宽, 同时存在阳性和阴性反应细胞。

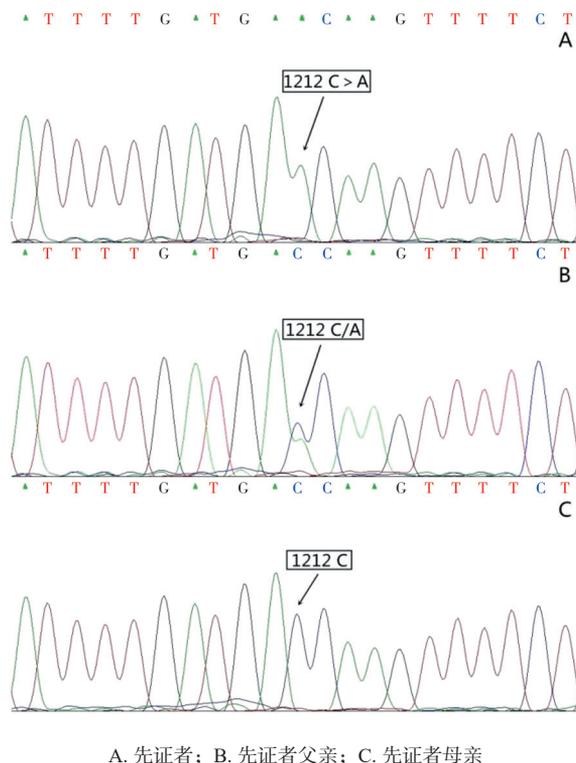


A. 空白对照; B. 阴性对照; C. 阳性对照; D. 先证者检测结果

图 3 先证者 RhD 抗原流式细胞术检测结果

2.3 RHD 基因检测及家系调查 对照结果格局图判断特异性扩增产物, 先证者及其父母 PCR-SSP 结果均为 RhD 阳性, 并排除中国汉族人群中常见的 RHD*weak partial 15, RHD*DVI.3, RHD*DEL1 等 RhD 变异型。先证者及其母亲均检出 Rh 融合盒子, 说明存在一条染色体 RHD 基因全缺失。先证者父亲融合盒子检测为阴性, 说明不存在 RHD 基

因全缺失。见图 4。经 RHD 基因编码序列分析发现, 先证者 RHD 基因第 9 外显子上的第 1212 位碱基发生 C > A 纯合突变, 其父亲 RHD 基因第 9 外显子上的第 1212 号碱基发生了 C > A 的杂合突变, 其母亲 RHD 基因 10 个外显子未检测到突变。RHD 基因第 9 外显子第 1212 位碱基 C > A 突变为 RHD*weak D type 72 的特征性突变点。



A. 先证者; B. 先证者父亲; C. 先证者母亲

图4 先证者及其父母 RHD 基因编码区序列分析结果

综合上述检测结果, 家系调查显示先证者父亲基因型为 RHD*weak D type 72 / RHD+; 母亲基因型为 RHD+ / RHD-。先证者 RHD 基因第 9 外显子第 1212 位碱基 C > A 突变遗传自其父亲, RHD 基因全缺失的染色体遗传自其母亲, 其基因型为 RHD*weak D type 72 / RHD-。

3 讨论

Rh 血型系统是人类血型系统中最为复杂、最具多态性的 1 个血型系统, D, C, c, E, e 为主要抗原, 其中 D 抗原具有很强的免疫原性。临床上根据个体是否存在 RhD 抗原分为 RhD 阳性和 RhD 阴性。RhD 抗原有很多变异体, 包括部分 D, 弱 D 和 D-elute。一般 RhD 阳性个体红细胞膜 RhD 抗原数量为 10 000 个左右, 弱 D 表型为 900 个左右^[11]。根据国际输血协会 (International Society of Blood Transfusion, ISBT) 等位基因命名表 (table of ISBT allele nomenclature version v5.0. Available at: <http://www.isbtweb.org/working-parties/red-cell-immunogenetics-and-blood-group-terminology>), 国际上已发现的弱 D 型约 150 种, 其中我国已发现 35 种^[10]。RHD*weak D type 72 等位基因 (c.1212C > A, p. Asp 404 Glu) 于 2007 年在 GenBank 发布 (登记号: EF103573), 随后被 ISBT 命名。2012 年, 吴筱莹等^[7]在深圳地区无偿献血者 RhD 血型鉴定中发现 1 例 RHD*weak D type 72 个体, 该个体 RhCE 表现型为 Ccee, 常规盐水法检测 RhD 抗原为阴性, IAT

检测为阳性, 表位检测结果则与 RhD 阳性红细胞完全一致, 提示 RHD*weak D type 72 红细胞可能不存在 RhD 抗原表位缺失, 只表现出 RhD 抗原的分子数量或抗体反应活性显著下降。2017 年, JI 等^[8]通过分析中国南方地区汉族人群 RHD 基因和杂合型发现 1 例 RHD*weak D type 72 个体, 该个体为 CcDee 表现型, D-screen 试剂检测未发现表位缺失, IgM 型抗 -D 抗体检测呈 ± ~ 1+ 强度, IgG 型抗 -D 抗体检测呈 2+ 或 4+ 强度。2019 年, ZHANG 等^[9]在中国东北地区 45 例血清学弱 D 型分子结构分析中发现 1 例 RHD*weak D type 72 个体以及 1 例 RHD*weak D type 72 与 RHD*DEL1 杂合个体, 并应用生物信息学分析预测 RHD*weak D type 72 的氨基酸置换位于胞内区。RHD*weak D type 72 等位基因自 2007 年在中国人人群中首次发现, 至今仅有以上个个例报道。本研究中先证者 RhD 血型经基因分型确定为 RHD*weak D type 72。采用 4 个不同厂家的抗 -D 抗体试剂检测先证者样本, 均表现为部分凝集的 RhD 阳性结果。结合以往的报道^[7-8], 可以判断 RHD*weak D type 72 红细胞拥有基本完整的 RhD 抗原表位。但对于该 RhD 变异型研究较少, 为安全起见, 先证者仍应视为 RhD 阴性受血者, 输注 RhD 阴性血液。

然而, 以往的研究中未见 RHD*weak D type 72 血清学结果表现为部分凝集的报道。本研究中, 排除操作错误、自身疾病以及异型红细胞输注史等情况, 先证者 RhD 血型鉴定经多次反复试验均表现为部分凝集。采用流式细胞术检测先证者 RhD 抗原强度, 结果显示先证者 RhD 抗原性减弱; 且先证者样本峰型变宽, 同时存在阳性和阴性反应细胞, 但未见双峰现象。分析本研究中微柱凝胶卡出现双群的原因为: 微柱凝胶法的工作原理为利用凝胶分子筛筛选, 当抗原抗体反应出现特异性凝集时, 发生聚集的红细胞被拦截在凝胶上层, 未反应的游离红细胞可沉降于凝胶底部。因血型抗原与对应抗体的结合是一种可逆的过程, RHD*weak D type 72 红细胞 RhD 抗原与抗 -D 抗体结合强度较弱, 在微柱凝胶卡检测过程中, 当离心产生的切应力超过抗原抗体结合的亲合力时, 较弱的凝集有可能被分开而出现阴性结果, 强凝集则仍被拦截在凝胶上层。目前, 临床仍常规采用血清学方法检测 RhD 血型^[12-13], 本研究中 RHD*weak D type 72 表现为部分凝集的血清学结果可为临床上对于 RhD 血型的判断提供一定的参考, 但本研究仍为个案报道, 对于 RHD*weak D type 72 的血清学特征仍需更为丰富的实验数据。

家系调查显示, 先证者分别从父亲和母亲

遗传 RHD*weak D type 72 和 RHD- 等位基因, 其 RHD*weak D type 72 等位基因由遗传获得, 而非由个体基因变异形成。家系调查结果为后续 RHD*weak D type 72 等位基因频率调查提供一定的参考意义。

参考文献:

- [1] LORD J. Time to re-evaluate rhesus testing and anti-D prophylaxis in abortion care[J]. *BMJ Sexual & Reproductive Health*, 2021, 47(2): 81-83.
- [2] EVANS M L, HOLMES B, DOWLING K, et al. Evaluating automated titre score as an alternative to continuous flow analysis for the prediction of passive anti-D in pregnancy[J]. *Transfusion Medicine (Oxford, England)*, 2021, 31(1): 36-42.
- [3] 饶神宗, 李归宁, 张敏, 等. RhD 抗原变异型同种免疫反应研究 [J]. *临床血液学杂志*, 2017, 30(8): 591-593.
RAO Shenzong, LI Guining, ZHANG Min, et al. The study of isoimmunity of RhD antigenic variant[J]. *Journal of Clinical Hematology*, 2017, 30(8): 591-593.
- [4] 姚韵, 许进明, 赵凌, 等. D 变异型受血者产生同种抗 -D 合并抗 -E 及抗 -C 抗体 1 例 [J]. *临床血液学杂志*, 2020, 33(2): 140-142, 147.
YAO Yun, XU Jinming, ZHAO Ling, et al. A case of recipient of D-variant type produced homologous anti-D combined with anti-E and anti-C antibodies[J]. *Journal of Clinical Hematology*, 2020, 33(2): 140-142, 147.
- [5] SANDLER S G, FLEGEL W A, WESTHOFF C M, et al. It's time to phase in RHD genotyping for patients with a serologic weak D phenotype[J]. *Transfusion*, 2015, 55(3):680-689.
- [6] MANGWANA S, GANGWAR V. Anti-D antibody in a D-positive patient: Autoantibody or development of alloantibody after platelet transfusion[J]. *Global Journal of Transfusion Medicine*, 2019, 4(2):231.
- [7] 吴筱莹, 庄乃保, 徐红先, 等. 1 例新的弱 D 型的鉴

定 [J]. *临床输血与检验*, 2012, 14(2):103-106, 109.

- WU Xiaoying, ZHUANG Naibao, XU Hongxian, et al. An identification of a new weak D phenotype[J]. *Journal of Clinical Transfusion and Laboratory Medicine*, 2012, 14(2): 103-106, 109.
- [8] JI Y L, LUO H, WEN J Z, et al. RHD genotype and zygosity analysis in the Chinese Southern Han D+, D- and D variant donors using the multiplex ligation-dependent probe amplification assay[J]. *Vox Sang*, 2017, 112(7):660-670.
- [9] ZHANG Xu, LI Guiji, ZHOU Zhuren, et al. Molecular and computational analysis of 45 samples with a serologic weak D phenotype detected among 132 479 blood donors in Northeast China[J]. *Journal of Translational Medicine*, 2019, 17(1): 393.
- [10] GAO Ming, CHEN Yuping. The RHD variants in Chinese population[J]. *Blood and Genomics*, 2020. DOI: 10.46701/BG.2020012020106
- [11] KÖRMÖCZI G F, GASSNER C, SHAO C P, et al. A comprehensive analysis of DEL types: partial DEL individuals are prone to anti-D alloimmunization[J]. *Transfusion*, 2005, 45(10):1561-1567.
- [12] 刘静娟, 李越, 何谦, 等. 陕西地区 RhD 阴性儿童患者 Rh 表型分布特征研究 [J]. *现代检验医学杂志*, 2020, 35(3):66-68.
LIU Jingjuan, LI Yue, HE Qian, et al. Distribution of RhD phenotypes among RhD-negative children patients in Shaanxi Province [J]. *Journal of Modern Laboratory Medicine*, 2020, 35(3):66-68.
- [13] 党盼玉, 苏珊, 刘志新, 等. RhD 阴性孕妇临床备血用血情况分析 [J]. *现代检验医学杂志*, 2020, 35(1): 130-132.
DANG Panyu, SU Shan, LIU Zhixin, et al. Analysis on RBC preparation and transfusion of RhD negative pregnant women [J]. *Journal of Modern Laboratory Medicine*, 2020, 35(1):130-132.

收稿日期: 2021-07-16

修回日期: 2021-12-15

(上接第 74 页)

- [16] ZHAO Mingfeng, MEI Qi, LI Xinjun, et al. CUL4B/miR-33b/C-MYC axis promotes prostate cancer progression[J]. *Prostate*, 2019, 79(5):480-488.
- [17] WANG Chen, ZHANG Jiawei, YIN Jie, et al. Alternative approaches to target MYC for cancer treatment[J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2021, 6(1):117.
- [18] 张遥, 任秀智, 韩金祥, 等. Wnt 信号通路与人疾病相关性的研究进展 [J]. *中国生物制品学杂志*, 2018, 31(1):81-86.
ZHANG Yao, REN Xiuzhi, HAN Jinxiang, et al. Progress in study on relationship between Wnt signaling pathway and human diseases [J]. *Chinese Journal of Biologicals*, 2018, 31(1): 81-86.
- [19] 丁界先, 张津, 陈永刚, 等. Wnt 信号通路与肿瘤发生的研究进展 [J]. *实用肿瘤学杂志*, 2019, 33(1):73-77.
DING Jiexian, ZHANG Jin, CHEN Yonggang, et al. Progress in Wnt signaling pathway and tumorigenesis

[J]. *Practical Oncology Journal*, 2019, 33(1):73-77.

- [20] HUANG Houfeng, FAN Xinrong, ZHANG Xuebin, et al. LncRNA CARLO-7 facilitates proliferation, migration, invasion, and EMT of bladder cancer cells by regulating Wnt/ β -catenin and JAK2/STAT3 signaling pathways [J]. *Transl Androl Urol*, 2020, 9(5):2251-2261.
- [21] LI Hui, WANG Ziwei, ZHANG Wei, et al. VGLL4 inhibits EMT in part through suppressing Wnt/ β -catenin signaling pathway in gastric cancer[J]. *Medical Oncology*, 2015, 32(3):83.
- [22] 王骞, 谭林, 屈伟明, 等. Wnt/ β -catenin 信号通路在胃癌中的研究进展 [J]. *医学综述*, 2020, 26(10): 1935-1940.
WANG Qian, TAN Lin, QU Weiming, et al. Research Progress of Wnt/ β -catenin signaling pathway in gastric cancer [J]. *Medical Recapitulate*, 2020, 26(10): 1935-1940.

收稿日期: 2021-09-13

修回日期: 2021-10-20