

· 综述 ·

鼠疫菌 pMT 质粒的模块结构及其连接方式

胡源 俞东征 海荣

鼠疫的致病菌鼠疫耶尔森菌有 3 个常见的质粒,编码一系列的毒力因子;其中最大的质粒 pMT 编码 F1 抗原和鼠毒素,是鼠疫菌两个比较重要的毒力因子。

一、鼠疫菌 pMT 质粒的序列及主要发现

1998 年,先后有 3 个 pMT 质粒的全序列在 GenBank 上发表,序列号分别为 AF053947、AL117211、AF074611。

1. AF074611 序列测定:由美国 Walter Reed 军事研究院、迈阿密大学医学院和威斯康星大学联合完成^[1],所用菌株为只含 pMT 质粒的 KIM10⁺ 菌株,方法为将质粒 DNA 随机剪切,再克隆到 M13Janus 载体,然后筛选克隆子提纯 DNA,用 Prism 循环测序试剂盒和 ABI 377 自动测序仪完成测序。最后用 DNASTAR 中的 Seqman II 软件拼接 DNA 序列片段, GeneQuest 软件完成基因分析。AF074611 序列全长 100 990 bp,共发现 115 个开放读码框(ORF),与一系列染色体、质粒和噬菌体同源^[1]。其中 5 个编码已知的毒力因子——F1 抗原和鼠毒素。43 个 ORF 在目前资料中找不到同源序列。另外确定了包含一个类 RepA 蛋白在内的 2450 bp 区域,可能是质粒复制的起点。质粒分配功能区位于距复制起点 36 kb 处,该区域与噬菌体 P1 和 P7 的 parABS 系统非常相似。明确定位了四个 IS 元件:一个 IS200、两个 IS100、一个 IS285。

2. AF053947 序列测定:是由人类基因组中心生物和生物技术研究计划组与密歇根州立大学微生物部共同完成的^[2]。所用菌株为 KIM5,方法为用华盛顿医科大学医学遗传学中心提供的雾化器剪切纯化的 pMT1 质粒,建立 M13 基因文库。合成片段末端用 T4DNA 聚合酶和 Klenow 片段的混合物加以修复。1~2 kb 的片段被连接到 M13mp18 的 Hinc II 位点。用于测序的单链模板以改进的煮沸法分离。每个克隆子序列采用以克隆子末端进行非对称聚合酶链反应(PCR)扩增,扩增产物直接测序。这一过程可以很快将很多相邻克隆子序列连接起来。相邻克隆子序列区间则以原始 pMT1 质粒为模板进行 PCR 扩增,产物克隆到 pGEM-Easy 载体,0.5~1.2 kb 的插入以 M13 引物和 M13 反向引物直接测序或以随机体外转座子轰炸法测序,含有压缩区和其他人为活动区的以 ABI-PRISM 着色终止子或 ABI BigDye 终止子重新测序。碱基组装由 PHRED/PHRAP 联合软件完成,基因分析由 BLAST 和 GeneMark 软件完成。AF053947

序列全长 100 984 bp,GC 含量为 50.2%,有两个相隔 25 kb 方向相反的 IS100,其中之一与一个 IS285 的部分拷贝相邻,另外还发现一个拷贝的 IS1541,5 个已知的编码 F1 抗原和鼠毒素的基因,分布于 pMT 质粒约 18 kb 范围内,GC 含量为 45.8%,与该质粒其余部分的 51.1% 明显不同,似乎满足毒力岛特征。此外,30 个基因可以找到同源序列,包括与 P7 噬菌体 parABS 系统相似区域和可能参与黏附作用的 ORF。44 个 ORF 在目前资料中找不到同源蛋白^[2]。

3. AL117211 序列测定:由英国 Wellcome Trust 基因组大学和伦敦卫生与热带医学学校传染病与热带疾病系等单位联合完成的^[3]。所用菌株为 CO-92,该菌株是近期分离自由感染的猫传播的早期肺鼠疫患者^[4]。方法为采用酚抽提后蛋白酶 K 消化法提取 DNA,再以超声波降解法制备 DNA 片段,以 pUC18 载体制备 1.0~2.5 kb 基因文库,用 ABI377 自动测序仪利用末端着色法完成测序。更大的 DNA 片段以 pSP64 和 lambda-FIX-II 载体建立基因文库,并作为序列组装的支架。基因组分析和分析使用 Artemis 软件。AL117211 序列全长 96 210 bp,GC 含量为 50.23%,有 103 个编码序列,2 个假基因,相隔约 34.6 kb,分别与 DNA 聚合酶 III 的 C 端和 N 端同源,而 DNA 聚合酶 III 的编码基因在 AF053947 和 AF074611 中是完整的。

二、鼠疫菌 pMT 质粒结构分析

pMT 质粒序列的同源性分析表明,具有与伤寒沙门菌、肠道菌基因高度同源的部分和目前仍为鼠疫菌高度特异的部分,这三个部分序列与其他类型可动遗传元件交错排列,构成了 pMT 质粒的镶嵌结构。对比上述发表的两个序列,发现它们各不相同,可大体分为 3 个模块结构,分别命名为伤寒菌同源区模块、鼠毒素模块、F1 抗原模块。

1. 伤寒菌同源区模块:该模块长约 59.3 kb,绝大多数基因与伤寒沙门菌的多重抗药性菌株 CT18 的 pHCM2 质粒同源^[5]。模块末端为 IS100,与之相邻有一段长约 17.7 kb 的 λ 噬菌体同源区,其中 6 个相邻的 ORF(约 11.8 kb)与其同源基因——编码 λ 蛋白 H、M、L、K、I、J 的排列顺序一致。与之相距约 25.9 kb 有一段长 2450 bp 的复制起始区,包括结构基因 repA 和包括复制起始重复区与调控机制在内的序列元件,其中 repA 基因产物与很多质粒复制起始蛋白高度同源,在 repA 基因上下游有两套 19 bp 同向重复序列,给质粒复制蛋白提供多重结合位点。此外在 repA 编码基因上游还有其他一些复制起始区特征性序列元件,包括 3 个 DnaA 结合位点、2 个富 AT 区和 11 个 Dam 甲基化酶识别序列(GATC),

repA 编码基因下游还有 13 个同向重复序列,它们不是复制功能必须的但可以控制质粒拷贝数^[6]。位于上述两个功能区之间距复制起始区约 6.9 kb 有一个类 IS200 元件被命名为 IS1541,与之相邻的 7 个连续的 ORF 约 3.9 kb 区域 GC 含量很低,到目前为止在现有资料中除 pHCM2 质粒外没找到同源区^[5]。

2. 鼠毒素模块:该模块长约 21.8 kb,末端为 IS285 元件,其中的大部分基因与肠道致病菌高度同源。此外还含有鼠疫菌特异的 ymt 基因,距离 IS285 约 3.5 kb。其编码产物为鼠毒素,已知 MT 属于磷脂酶 D 超家族(PLD)^[7],不是对鼠类毒力所必须的,而主要在昆虫媒介中起作用^[8]。该模块还有一个约 2.5 kb 的质粒分配系统,与 ymt 基因相隔 4.1 kb 左右。与噬菌体 P1、P7 的 parABS 系统高度同源。pMT_{parA}、parB 基因产物与 P1 和 P7 的 ParA、ParB 同源性很高,另外 pMT1 parS 位点的基因组成、空间结构和特异性序列亚单位与 P1 和 P7 的 parS 位点非常相似,提示他们可能有相同的作用方式^[9]。另外,ymt 基因两侧有许多非精确转座和重组的痕迹^[11],例如 ymt 基因两侧有 4 段与鼠伤寒沙门菌质粒分配区的同源区,其中两段为不完全重复序列分别位于 ymt 基因两侧。此外还有很多转座子残基及与其他质粒或噬菌体的同源区,说明 ymt 基因可能是通过不规则重组从其他遗传元件水平传递而来。

3. F1 抗原模块:该模块长约 15.1 kb,代表基因为位于该模块末端的长 5.1 kb 左右的 caf 操纵子,产物为 F1 抗原及其辅助因子,是鼠疫菌高度特异的基因。包括结构基因 caf1,编码分子伴侣蛋白、锚定蛋白的 caf1M、caf1A 基因,和一个调节基因 caf1R^[10]。其中 caf1R 中有一小段与大肠埃希菌编码菌毛表达调控蛋白的 afrR 基因同源性很高,提示其可能属于 AraC 家族成员^[11]。此外,F1 抗原操纵子两侧有与其他外源基因同源的转座酶和整合酶的编码基因,提示 F1 抗原可能来源于基因水平传递^[11]。该模块的另一末端为 DNA 聚合酶 III 编码基因的一部分。DNA 聚合酶 III 编码基因及其相邻的整合酶、cobS 和 cobT 基因也与 pHCM2 质粒高度同源^[5],并且没有明显的打断,位于整个 pHCM2 质粒同源区的边缘。

三、三种序列连接方式的差异

鼠疫菌被认为是由假结核耶尔森菌进化而来,有三个生物型分别对应于历史上的三次大流行,分别为古典型、中世纪型和东方型^[5]。AF053947 和 AF074611 所使用的 KIM 菌株是实验室保存的分离自中东的中世纪型菌株^[12],AL117211 所使用的菌株 CO-92 是最近分离自美国的一例早期肺鼠疫患者的东方型菌株。比较这三个序列,发现均由上述三个模块构成,但连接方式不同。此外,两个 KIM 序列还有一个拷贝的 IS100 和两段长度分别为 2109 和 2606 bp 的伤寒沙门菌的同源区。这 3 段序列在 AF053947 和 AF074611 中的位置和方向不同,在 AL117211 中这 3 段序列缺失,IS100 插入位点也发生变化。鼠毒素模块、F1 抗原模块在这三个序列中只有几个碱基的不同;伤寒菌同源区模块在

AF053947 和 AF074611 中只有个别碱基的不同,而 AL117211 序列与前两者相比在距该模块末端 IS100 约 22.6 kb 处有 63 bp 碱基的缺失,导致 KIM 序列中两个相邻的 ORF 合并^[5]。

AF053947 中两段伤寒菌同源区位于 IS100 两侧,三者相连位于 F1 抗原模块和鼠毒素模块之间,与之相连的分别是鼠毒素模块的 IS285 末端和 F1 抗原模块的 caf 操纵子末端。伤寒菌同源区模块的 IS100 末端与鼠毒素模块相连,另一端与 F1 抗原模块相连。AF074611 与 AF053947 相比在两个反向 IS100 之间发生了 24 kb 的序列翻转,即鼠毒素模块和相邻的 2606 bp 伤寒菌同源区发生了倒转。AL117211 与 AF053947 差别较大,除上述两段伤寒菌同源区和一段 63 bp 的缺失外,IS100 插入位置也不同——插入 DNA 聚合酶 III 的编码基因,并造成了 37 kb 序列翻转,形成了两个 DNA 聚合酶 III 的假基因,即 F1 抗原模块和鼠毒素模块连接后翻转插入两个 IS100 之间。三个序列中的 2 拷贝 IS100 都是方向相反。

四、几点推论

1. pMT 质粒可能的形成原因:最近伤寒沙门菌的一个多重抗药性菌株 CT18 完成了全基因组测序,其中包括一直被认为是神秘质粒的 pHCM2^[13]。结果发现 pHCM2 质粒 57% 以上的编码序列与 pMT 质粒有 97% 以上的同源性^[14]。该高度同源区在 KIM 序列中占 56.2% 以上,在 CO-92 序列中占 52% 以上。并且,除个别小片段的插入外,pHCM2 同源区在 pMT 质粒中的分布是连续的,尤其是在 KIM 序列中。pHCM2 并不编码明显的毒力基因或抗药基因,但编码一系列 DNA 复制和代谢相关基因^[13]。pMT 质粒中的转录起始区就位于同源区内,所以 pHCM2 同源区对于 pMT 质粒的存活是非常重要的。质粒分配系统是对质粒存活非常重要的另一个功能区,位于 pMT 质粒与其他肠道菌高度同源的区域。

所以推论鼠疫菌在进化过程中同时获得了 pHCM2 同源区和肠道菌同源区的一部分或全部,因为只有同时获得复制和分配功能才能保证质粒的遗传稳定性。在此基础上获得了鼠疫菌特异的毒力基因 ymt 和 caf 操纵子。pHCM2 同源区和肠道菌同源区的连接可能是通过 λ 噬菌体同源区发生同源重组完成的,理由是 pMT 质粒的 λ 噬菌体同源区的一部分位于 pHCM2 同源区,且 λ 蛋白的排列顺序与同源基因一致,另一部分位于肠道菌同源区,在 pHCM2 质粒中找不到对应区。所以认为 λ 噬菌体同源区重组,完成了两个部分的连接。

是否存在 pHCM2 质粒从 pMT 质粒获得上述基因片段的可能呢?分析两个质粒的基因特征,Prentice 等^[5]认为可以排除这种可能性,原因是:首先,二者同源区的 GC 含量(51.9%)与伤寒菌背景(52.05%)更接近(鼠疫菌 GC 含量为 47.6%);其次,pHCM2 质粒全序列有 32 个 Chi 位点 GCTGGTGG 和其互补序列的分布,而 pMT 质粒的 Chi 位点

分布只局限于二者同源区,而 pMT 质粒的另外两个质粒未发现 Chi 位点分布,Chi 位点是大肠埃希菌重组修复酶 RecBCD 的识别位点,RecBCD 在 Chi 位点附近将单链 DNA 切断,从而使 DNA 重组成为可能^[15];此外,pMT 质粒同源区外的插入序列(IS100、IS1541、IS285)在鼠疫菌基因组的其他位置都有分布,而在 pHCM2 质粒或伤寒菌染色体中没有分布。

pHCM2 质粒与 pMT 质粒同源区虽然在 pMT 质粒中连续分布,但在 pHCM2 中是不连续的,这一结果是多次还是一次重组的结果呢?我们认为是由一次重组造成的,首先,pHCM2 质粒上缺少插入序列,发生多次重组的可能性很低;其次,两个质粒同源区的基因排列顺序和方向是一致的(CO-92 发生的翻转除外),而多次重组出这么规整的结果的可能性更低。对于出现这种结果可能的原因是,发生重组时同源区在 pHCM2 质粒上的排列是连续的,只是后来进化过程中获得的其他基因片段打断了这一区域;另一种解释是细菌可能通过某种类似于真核基因内含子切除的机制完成了外源基因的选择性获得。

抗性伤寒菌株 CT18 是首先从越南的一例伤寒患者分离到的,长 106 kb。Kidgell 等^[14]用 PCR 技术在越南的其他菌株及东南亚其他国家和巴基斯坦检测 pHCM2 质粒或与 pHCM2 相似的质粒,都没有发现 pHCM2 质粒的分布。这就大大局限了 pHCM2 与 pMT 质粒接触的机会。伤寒菌的宿主局限于人和少数高级灵长类,经消化道感染。而鼠疫菌虽然在动物模型中有口腔途径感染,但并不侵袭消化道,另外鼠疫菌的外界生存能力很低,所以二者接触可能只局限于双重感染的人类宿主或叮咬过两种疾病病例的蚤类肠道。Prentice 等^[5]提出,伤寒菌可能通过与假结核耶尔森菌之间发生质粒传递,从而使后者获得原始 pMT 质粒,并进一步进化成鼠疫菌。理由是假结核菌是胃肠道致病菌,宿主范围更广,可以大大提高在环境或脊椎动物肠道系统与伤寒菌接触的机会。

2. 三种序列的进化关系:有人提出鼠疫菌东方型在进化上晚于古典型和中世纪型^[5],我们仅从 pMT 质粒的三个序列分析中为这一说法提供几点支持。我们认为 AL117211,即东方型菌株 CO-92 的质粒序列是由另外两种质粒进化而来。理由是:首先,KIM 序列中位于伤寒菌同源区模块和 F1 抗原模块之间的 DNA 聚合酶 III 编码基因是完整的,而 CO-92 中的翻转造成了该基因的断裂,产生了两个假基因;其次,与伤寒菌高度同源的区域在 KIM 中的分布是连续的,而 CO-92 的翻转导致了该区域的断裂。如果上述质粒获得途径成立的话,我们就有理由认为伤寒同源区连续的菌株在进化上早于该区域断裂菌株。

两个 KIM 菌株 pMT 质粒序列的进化关系我们无法确定,因为二者的惟一区别就是两个 IS100 之间序列的翻转,而这一现象在菌株长期冻存后多次传代及克隆中经常发生。

3. 其他:本实验室曾以嵌套式 PCR,及跨模块 PCR 检测

了我国青海、云南和辽宁等地区的部分菌株。发现所有检测菌株 F1 抗原模块和鼠毒素模块之间的连接方式与 AL117211 相同,即 IS100 及其两侧 2109 bp、2606 bp 的伤寒沙门菌的同源区缺失,Prentice 等^[5]通过 PCR 技术大量检测东方型 pMT 质粒后认为,这两段伤寒菌同源区的缺失是东方型菌株特有的特征。但没有发现 AL117211 的 37 kb 的翻转,而且发现 F1 抗原模块与伤寒菌同源区模块之间的连接方式共有两种形式,一种是与 KIM 菌株相同的以完整的 DNA 聚合酶 III 连接,另一种是有一个拷贝的 IS100 插入,而鼠毒素模块与伤寒菌同源区模块之间有一部分菌株的连接方式可能与 AF053947 相同,还有一部分菌株可能存在插入序列。所以我国菌株 pMT 质粒有多种与已发表的序列不同的连接方式,其中大多数与 AF053947 相似,但除上述东方型菌株特异的缺失外还存在一些细微区别。另外,我们实验所用是当年分离菌株提取的染色体,没有经过克隆等实验过程,可以避免插入序列造成的重组,保证实验结果的忠实性。此外,我国青海地区存在相对分子量(M_r)为 52×10^3 和 90×10^3 的 pMT 质粒,与其他地区普遍存在的 $M_r 65 \times 10^3$ 质粒大小差异很大。现在我们已经肯定了 $M_r 52 \times 10^3$ 质粒缺失发生在伤寒菌同源区末端的噬菌体同源部分。所以我们认为 pMT 质粒结构绝不止这三种类型。我国菌株的 pMT 质粒结构究竟有多少种还有待于进一步研究。

参 考 文 献

- 1 Lindler LE, Plano GV, Burland V, et al. Complete DNA sequence and detailed analysis of the *Yersinia pestis* KIM plasmid encoding murine toxin and capsular antigen. *Infect Immun*, 1998, 66:5731-5742.
- 2 Hu P, Elliott J, McCready P. Structural organization of virulence-associated plasmids of *Yersinia pestis*. *J Bact*, 1998, 180:5192-5202.
- 3 Parkhill J, Wren BW, Thomson NR, et al. Genome sequence of *Yersinia pestis*, the causative agent of plague. *Nature*, 2001, 413:523-527.
- 4 Doll JM, Zeitz PS, Ettestad P, et al. Cat-transmitted fatal pneumonic plague in a person who traveled from Colorado to Arizona. *Am J Trop Med Hyg*, 1994, 51:109-114.
- 5 Prentice MB, James KD, Parkhill J, et al. *Yersinia pestis* pFra shows biovar-specific differences and recent common ancestry with a *Salmonella enterica* serovar typhi plasmid. *J Bacteriol*, 2001, 183:2586-2594.
- 6 Mukhopadhyay G, Carr KM, Kaguni JM, et al. Open-complex formation by the host initiator, DnaA, at the origin of P1 plasmid replication. *EMBO J*, 1993, 12:4547-4554.
- 7 Rudolph AE, Stuckey JA, Zhao Y, et al. Expression, characterization, and mutagenesis of the *Yersinia pestis* murine toxin, a phospholipase D superfamily member. *J Biol Chem*, 1999, 274:11824-11831.
- 8 Hinnebusch J, Cherepanov P, Du Y, et al. Murine toxin of *Yersinia pestis* shows phospholipase D activity but is not required for virulence in mice. *Int J Med Microbiol*, 2000, 290:483-487.

9 Youngren B, Radnedge L, Hu P, et al. A plasmid partition system of the P1-P7par family from the pMT1 virulence plasmid of *Yersinia pestis*. J Bacteriol, 2000, 182: 3924-3928.

10 Titball RW, Howells AM, Oyston PC, et al. Expression of the *Yersinia pestis* capsular antigen (F1 antigen) on the surface of an *aroA* mutant of *Salmonella typhimurium* induces high levels of protection against plague. Infect Immun, 1997, 65: 1926-1930.

11 Karlyshev AV, Galyov EE, Abramov VM, et al. Caf1R gene and its role in the regulation of capsule formation of *Y. pestis*. FEBS Lett, 1992, 305: 37-40.

12 Perry RD, Fetherston JD. *Yersinia pestis* etiologic agent of plague. Clin Microbiol Rev, 1997, 10: 35-66.

13 Parkhill J, Dougan G, James KD, et al. Complete genome sequence of a multiple drug resistant *Salmonella enterica* serovar Typhi CT18. Nature, 2001, 413: 848-852.

14 Kidgell C, Pickard D, Wain J, et al. Characterisation and distribution of a cryptic *Salmonella typhi* plasmid pHCM2. Plasmid, 2002, 47: 159-171.

15 Taylor AF, Smith GR. Regulation of homologous recombination: Chi inactivates RecBCD enzyme by disassembly of the three subunits. Genes Dev, 1999, 13: 890-900.

(收稿日期: 2003-03-27)

(本文编辑: 尹廉)

· 疾病控制 ·

中国部分地区 2003 年口腔疾病状况监测结果分析

李刚 黄少宏 姚爱娣 杨萍 饶志敏 杨敏 武东峰

为了探索我国家庭成员口腔疾病的流行现状,于 2003 年开展了一次全国家庭口腔健康询问调查,现将口腔疾病状况监测结果报道如下。

1. 对象与方法: 家庭成员口腔疾病状况调查表根据世界卫生组织制定的口腔健康调查基本方法设计,采用分层抽样方法,根据我国不同地区经济(人均 GDP)发展水平分层,抽取我国 6 个不同经济发展水平的县/区为调查样本地区,各抽取 100 户进行入户家庭口腔健康询问调查。利用 SPSS 11.5 软件统计不同类型地区家庭成员患龋率、龋均、牙龈炎患病率、牙结石检出率、正畸需要情况。

2. 结果: 完成调查 6 个样本县/区,共 587 户 1558 人。其中发达地区 193 户 501 人、中等地区 194 户 494 人、发展中地区 200 户 563 人。通过玛叶指数与拟合度检验方法对调查数据质量与代表性的检验和判断,认为这次调查样本对全国总体样本的代表性较好。结果表明(表 1),我国家庭成员患龋率为 52.05%,龋齿均数为 1.76,牙龈炎患病率为 16.05%,牙结石检出率为 39.35%,早期牙周病患病率为 4.43%,晚期

牙周病患病率为 1.73%,需修复上颌人数为 8.28%、下颌人数为 9.95%,需要正畸人数为 6.23%。

3. 讨论: 世界卫生组织各国口腔疾病资料显示出两种明显不同的发展趋势。一种是在许多高度工业化国家,近 20 多年来,由于一些国家提供了优良的口腔保健服务和采取了较多的预防措施,致使曾一度广泛流行的龋病逐步得以控制,龋病患病率呈现明显的下降趋势。然而,随着工业化带来的生活条件和生活方式的改变,一些发展中国家的龋齿发生率有所增加。生活富裕了,食物趋向精细,食糖量增加,患龋的可能性就增加。我国的情况大致与之相同,发展中地区龋病的发病率较发达地区高;本次调查说明口腔疾病是我国居民的常见病、多发病。调查表明我国家庭成员龋齿充填率仅为 25.84%,与发达国家龋齿充填率在 80% 以上相比,有很大的差距。建议必须加快建立我国口腔保险制度和卫生服务体系,定期对人群的口腔疾病状况进行检查与评估,做到对口腔疾病的先防后治,早期发现、早期诊断、早期治疗,推广裂沟封闭剂、采用氟化物防龋等措施。

表1 不同类型地区居民口腔疾病检出率

地区	受检人数	龋齿补				牙龈炎		牙结石		需要正畸	
		人数	检出率(%)	牙数	$\bar{x} \pm s$	人数	患病率(%)	人数	检出率(%)	人数	检出率(%)
发达	501	242	48.30	801	1.58 ± 2.42	75	14.97	140	27.94	12	2.40
中等	494	213	43.12	597	1.23 ± 2.07	53	10.73	205	41.50	28	5.67
发展	563	356	63.23	1339	2.38 ± 3.13	122	21.67	268	47.60	57	10.12
合计	1558	811	52.05	2737	1.76 ± 2.65	250	16.05	613	39.35	97	6.23
		$\chi^2 = 94.909$ $P = 0.050$		$F = 27.379$ $P = 0.030$		$\chi^2 = 74.661$ $P = 0.000$		$\chi^2 = 123.722$ $P = 0.000$		$\chi^2 = 57.555$ $P = 0.000$	

作者单位: 710032 西安, 第四军医大学口腔医学院口腔预防医学教研室(李刚); 广东省口腔医院(黄少宏); 大连市口腔医院(姚爱娣); 深圳市龙岗医院口腔科(杨萍); 遵义市口腔医院(饶志敏); 济宁市口腔医院(杨敏); 宣川县医院口腔科(武东峰)

(收稿日期: 2004-09-09)

(本文编辑: 尹廉)