

· 实验室研究 ·

北京地区 2006 年流行的 3、7 和 11 型腺病毒
部分六邻体基因序列分析

邓洁 钱渊 赵林清 朱汝南 王芳 孙宇

【摘要】 目的 分析 2006 年北京地区流行的 3、7 和 11 型腺病毒(ADV)的部分六邻体基因序列,了解该地区 ADV 流行型别及六邻体基因变异情况。方法 采集急性呼吸道感染患儿咽拭子或鼻咽分泌物标本,分离病毒及免疫荧光快速抗原检测。对抗原检测和/或病毒分离为 ADV 阳性的 61 份标本进行 PCR 分型检测。随机选取分离到的 3 株 ADV3,3 株 ADV7 和 3 株 ADV11 毒株,扩增其六邻体近 5' 端 1278 bp 基因片段进行序列分析并与 GenBank 发表的部分序列进行比较和进化树分析。结果 61 份 ADV 检测为阳性的标本中,ADV3 占 60.73% (37/61);ADV7 占 27.9% (17/61);ADV3 和 ADV7 混合感染占 1.6% (1/61);ADV11 占 4.9% (3/61);非 3、7、11 和 21 型 4.9% (3/61);未检测到 21 型 ADV。3 株 ADV3 分离株与 2005 年广州分离株(AV878716)亲缘关系最近,与其他株比较,3 株北京分离株氨基酸的变异位点主要有 3 个。3 株 ADV7 分离株与 1998 年日本分离株(AF053086)的亲缘关系最近。与其他株比较,3 株北京分离株氨基酸的变异位点主要有 1 个。3 株 ADV11 分离株与 2004 年日本分离株(AB162772)的亲缘关系最近(100%),但是这 4 株(包括日本的毒株)与其他毒株比较其氨基酸的变异位点有 12 个。相对于 3 型和 7 型,11 型 ADV 的变异最大,表现为变异的氨基酸位点的分布较为分散,其次是 3 型 ADV,而 7 型 ADV 的变异较小。结论 2006 年北京地区引起婴幼儿急性呼吸道感染的 ADV 以 3 型为主,7 型为辅,11 型较为少见,未发现 21 型;3、7 和 11 型 ADV 北京分离株与 GenBank 中其他序列比较虽然有着较高的同源性,但是还都有一定的核苷酸和氨基酸的变异;变异多发生在抗原决定簇密集的 HVR₁ 区和 HVR₇ 区。

【关键词】 腺病毒;多重-聚合酶链反应;六邻体基因;序列分析

Sequence analysis for Hexon genes of types 3, 7 and 11 of adenoviruses identified in Beijing DENG Jie, QIAN Yuan, ZHAO Lin-qing, ZHU Ru-nan, WANG Fang, SUN Yu. Laboratory of Virology, Beijing Municipal Laboratory of Infection and Immunity, Capital Institute of Pediatrics, Beijing 100020, China

Corresponding author: QIAN Yuan, Email: yqianbjc@263.net

【Abstract】 Objective The objective of this study was to develop a rapid, sensitive and specific method for identifying and typing for adenovirus from clinical specimens and to learn about the viruses identified in Beijing on the molecular bases. Methods Primers were designed using hexon gene of adenovirus as target. One primer pair was designed as universal primers for amplifying a 1278 bp gene fragment located at the hexon gene of adenovirus types 3, 7, 11 and 21. Four primer pairs located within the region of this 1278 bp fragment were designed specifically for amplifying adenoviruses types 3, 7, 11 and 21, which were used for a multiplex nest-PCR in a single tube. The products from this multiplex nest-PCR were 502 bp (for type 3), 311 bp (for type 7), 880 bp (for type 11) and 237 bp (for type 21), respectively. The type of the adenovirus being tested could be determined after agarose electrophoresis analysis of the PCR products. Sequencing was performed for part of the Hexon genes at the 5' end from types 3, 7 and 11 strains isolated from clinical specimens and the sequences were compared with corresponding genes published in GenBank. Results PCR products with predicted sizes were visualized in the agarose gel for prototype strains of adenovirus types 3, 7, 11 and 21, but not for other respiratory viruses, indicating that the technique is specific for typing without cross reaction with other viruses. Out of 61 clinical specimens which had been proved to be adenovirus positive by tissue culture and/or immunofluorescence assay, 37 were found as adenovirus type 3 (37/61, 60.73%), 17 as adenovirus type 7 (17/61, 27.9%), 3 was adenovirus type 11 (3/61, 4.9%). 1 was positive for both type 3 and 7 (1/61, 1.6%), suggesting that the patient was co-infected with type 3 and 7 adenoviruses. No adenovirus type 21

was detected. Out of the 61 positive specimens, three showed positive on both tissue culture and immunofluorescence but could not be identified under the methods we used, suggesting that these 3 strains (4.9%) were with the types other than types 3, 7, 11 and 21. Data from sequence analysis indicated that adenoviruses types of 3, 7 and 11 in this study shared high homology with corresponding types of the strains published in GenBank. Three of the type 3 adenovirus in this study shared highest homology with the adenovirus type 3 identified in Guangzhou, China in 2005. Three of the type 7 adenovirus shared highest homology with the adenovirus type 7 identified in Japan in 1998 and 3 of type 11 adenovirus shared highest homology with the adenovirus type 11 identified in Japan in 2004. Comparing with types 3 and 7, the type 11 in this study showed highest diversity with the corresponding type in GenBank, indicated by the dispersing of the varied amino acids within the region of HVR₁ and HVR₂ of the Hexon genes. **Conclusion** This multiplex nest-PCR method had the advantages of rapid, sensitive and specific and could be used for identifying types of adenoviruses in clinical specimens. Although adenovirus types 3, 7 and 11 from Beijing strains shared high homology with the corresponding genes in GenBank, some variances were noticed, especially in type 11 strains.

【Key words】 Adenovirus; Multiplex nest-PCR; Hexon gene; Sequence analysis

人类腺病毒(HADV)感染在全球范围内广泛流行,在婴幼儿下呼吸道感染病例中,有5%与腺病毒(ADV)有关^[1],迄今为止,已发现51个血清型,分属于6个不同的亚组^[2],与呼吸道感染有关的是B、C和E组,尤其是B亚组可引起严重的呼吸道疾病^[3]。六邻体(hexon)作为ADV的主要结构蛋白,能够刺激机体产生中和抗体,六邻体的抗原决定簇主要存在于其两个环区L₁和L₂。ADV感染可引起多种疾病,如肺炎、眼结膜炎、脑炎、膀胱炎等^[4],在婴幼儿中ADV可引起严重的甚至是致命的肺炎或支气管炎^[5]。在我国引起呼吸道感染的ADV主要是3、7、11型等^[6],也有文献报道3、7、21型曾引起过严重的致死性肺炎及眼结膜炎等呼吸系统疾病的暴发流行^[7],近年来全国各地均有ADV流行的报道^[8],为了解北京地区ADV的分子流行病学特点,我们将2006年从急性呼吸道感染的患儿中检测到的ADV进行常见型别3、7、11和21型分型检测,并对其中的9株病毒进行部分六邻体基因的序列分析。

材料与方 法

1. 标本来源:3521份呼吸道标本(采自门诊患儿的咽拭子标本和住院患儿的鼻咽分泌物吸出液标本)均来自首都儿科研究所附属儿童医院临床诊断为肺炎及支气管炎的患儿,采集时间为2006年1-12月。

2. 病毒分离:对收集的部分患儿标本,常规处理后接种Hep-2细胞,每日观察细胞病变,对出现细胞变圆、聚集成堆等疑似ADV病变的再用免疫荧光方法进行鉴定,然后进行PCR分型鉴定。

3. 免疫荧光检测7种常见呼吸道病毒的抗原:对收集的鼻咽洗液标本,采用美国Chemicon公司生

产的试剂盒进行包括ADV在内的7种常见呼吸道病毒抗原的快速检测^[6]。

4. PCR分型检测:采用多重巢式PCR,对抗原检测为ADV阳性的61份标本进行检测。一次扩增引物为AD-A、AD-B,预期扩增1278bp的六邻体基因,二次扩增引物共有4对,分别针对3、7、11和21型ADV,预期扩增产物分别为502、311、880和237bp^[6]。

5. ADV分离株的序列分析:随机选取3株ADV3(编号为H9049, F1721, F2279),3株ADV7(编号为F379, F762, F893)和3株ADV11(编号为F311, F358, F454),用AD-A和AD-B引物扩增其六邻体近5'端1278bp。

对H9049和F379采用基因克隆方法,扩增产物经琼脂糖凝胶电泳纯化后,与载体pBS-T进行连接。连接产物转化大肠埃希菌DH5a感受态细胞。用PCR筛选出阳性克隆后进行核苷酸序列测定;其余7株采用PCR产物直接测序。测序反应由奥科生物技术有限公司完成。将9株六邻体蛋白的核苷酸序列输入GenBank数据库中,获得录入号分别为EU513211(H9049),EU513209(F1721),EU513210(F2279),EU513205(F379),EU513207(F762),EU513208(F893),EU513203(F311),EU513204(F358),EU513206(F454)。使用DNASar软件中的MegAlign中的Jotun Hein方法进行序列比较和进化树分析。同时和GenBank中选取的参考株进行比对分析(表1)。

结 果

1. 病毒分离及荧光检测:2006年共收集急性呼吸道感染患儿咽拭子及鼻咽分泌物标本3521份,61

份经病毒分离和/或间接免疫荧光检测确定为 ADV 阳性,阳性率为1.7%(61/3521)。

2. PCR 分型:61 份经病毒分离和/或间接免疫荧光检测确定为 ADV 阳性的标本各取 100 μl 提取 DNA,以多重巢式 PCR 进行 ADV3、7、11 和 21 型的分型鉴定。其中 ADV3 型 37 份(60.7%),7 型 17 份(27.9%),3 型和 7 型混合感染 1 份(1.6%),11 型 3 份(4.9%),非 3、7、11 和 21 型 3 份(4.9%),未检测到 21 型 ADV。

3. 9 株分离株的序列分析:

(1) 同源性分析:将 3 株 ADV3 分离株 H9049 (EU513211)、F1721 (EU513209) 和 F2279 (EU513210) 的 1189 bp 的六邻体(位于 430~1618) 基因片段与 GenBank 发表的其他 8 株相应序列 (AF542115、AF542125、AY599834、AY599836、X76549、X76552、AY878716 和 DQ086466) 比较,3 株分离株与其他毒株核苷酸序列的同源性在 96.3%~99.7%,氨基酸的同源性 96.0%~99.0%,而这 3 株北京分离株之间的同源性较高,分别为 99.7%~99.9% 和 99.5%~100.0% (表 2)。与其他株比较,3 株北京分离株氨基酸的变异位点主要

有 3 个,分别位于六邻体的第 418、429 和 439 位氨基酸,分别由 T、T、A 变为 R、A、D。

3 株 ADV7 分离株 F379 (EU513205)、F762 (EU513207) 和 F893 (EU513208) 的 1150 bp 的六邻体(位于 432~1581) 基因片段与 GenBank 发表的其他 10 株相应序列 (AC_000018, AF053085, AF053086, AY495969, AY594256, AY601634, U75952, U75954, U75956, U77390) 比较,3 株分离株与其他株核苷酸序列的同源性在 99.2%~100.0%,氨基酸的同源性 98.2%~100.0%,3 株分离株之间分别为 99.7%~99.9% 和 99.5%~100.0% (表 3)。与其他株比较,3 株北京分离株氨基酸的变异位点主要有 1 个,位于六邻体的第 443 位,由 L 变为 Q。

3 株 ADV11 分离株 F311 (EU513203), F358 (EU513204), F454 (EU513206) 的 1157 bp 六邻体(位于 432~1588) 基因与 GenBank 发表的其他 5 株相应序列 (AC_000015, AB018424, AB162772, AF532578, AY163756) 比较,3 株分离株与 2004 年日本分离株的核苷酸和氨基酸的同源性均为 100%,而这 4 株与其他 4 株核苷酸的同源性为

表1 用于六邻体基因序列比较的 ADV3、7、11 型毒株来源

ADV3 型			ADV7 型			ADV11 型		
编号	国家	年代	编号	国家	年代	编号	国家	年代
AF542115	韩国	2003	AC_000018	英国	2005	AB018424	日本	1999
AF542125	韩国	2003	AF053085	日本	1998	AB162772	日本	2004
AY599834	美国	2006	AF053086	日本	1998	AC_000015	英国	2005
AY599836	美国	2006	AY594256	美国	2006	AF532578	瑞典	2003
AY878716	中国	2005	AY495969	中国	2004	AY163756	美国	2005
AQ086466	瑞士	2005	AY601634	美国	2006	EU513203	中国	2006
X76552	德国	2005	U75952	瑞典	2001	EU513204	中国	2006
X76549	德国	2005	U75954	瑞典	2001	EU513206	中国	2006
EU513211	中国	2006	U75956	瑞典	2001			
EU513209	中国	2006	U77390	瑞典	2001			
EU513210	中国	2006	EU513205	中国	2006			
			EU513207	中国	2006			
			EU513208	中国	2006			

表2 ADV3 部分六邻体基因核苷酸和氨基酸的同源性分析

编号	AF542115	AF542125	AY599834	AY599836	X76549	X76552	AY878716	DQ086466	EU513211	EU513209	EU513210
AF542115		99.3	98.0	99.2	98.6	98.0	97.6	95.7	98.7	98.9	98.8
AF542125	98.0		98.1	98.9	98.7	98.1	97.8	95.9	98.9	99.1	99.0
AY599834	97.2	97.7		98.7	98.4	100.0	99.7	96.3	98.6	98.7	98.7
AY599836	97.2	97.7	100.0		99.3	98.7	98.4	96.4	99.5	99.7	99.6
AY878716	97.2	97.7	97.7	97.0		98.4	98.1	96.0	99.5	99.7	99.6
X76549	97.2	97.7	100.0	100.0	97.0		99.7	96.3	98.6	98.7	98.7
X76552	97.0	97.5	99.7	99.7	96.7	99.7		96.0	98.2	98.4	98.3
DQ086466	95.7	96.2	96.0	96.0	95.5	96.0	95.7		96.3	96.5	96.4
EU513211	97.7	98.2	97.5	97.5	98.5	97.5	97.2	96.0		99.8	99.7
EU513209	98.2	98.7	98.0	98.0	99.0	98.0	97.7	96.5	99.5		99.9
EU513210	98.2	98.7	98.0	98.0	99.0	98.0	97.7	96.5	99.5	100.0	

注:上三角部分为核苷酸同源性(%),下三角部分为氨基酸同源性(%)

表3 ADV7 部分六邻体基因核苷酸和氨基酸的同源性分析

编号	AC_000018	AF053085	AF053086	AY495969	AY594256	AY601634	U75952	U75954	U75956	U77390	EU513205	EU513207	EU513208
AC_000018		99.9	99.9	100.0	99.9	99.9	99.7	99.9	99.7	99.5	99.8	99.9	99.7
AF053085	99.7		99.8	99.9	99.8	99.8	99.7	99.8	99.7	99.4	99.7	99.8	99.7
AF053086	99.7	99.5		99.9	99.8	100.0	99.7	99.8	99.7	99.4	99.9	100.0	99.8
AY495969	100.0	99.7	99.7		99.9	99.9	99.7	99.9	99.7	99.5	99.8	99.9	99.7
AY594256	100.0	99.7	99.7	100.0		99.8	99.7	99.8	99.7	99.4	99.9	99.8	99.7
AY601634	99.7	99.5	99.5	99.7	99.7		99.7	99.8	99.7	99.4	99.7	99.8	99.7
U75952	99.7	99.5	99.5	99.7	99.7	99.5		99.8	99.7	99.4	99.6	99.7	99.7
U75954	100.0	99.7	99.7	100.0	100.0	99.7	99.7		99.8	99.6	99.7	99.8	99.7
U75956	99.7	99.5	99.5	99.7	99.7	99.5	99.5	99.7		99.4	99.6	99.7	99.5
U77390	99.0	98.7	98.7	99.0	99.0	98.7	98.7	99.0	98.7		99.3	99.4	99.2
EU513205	99.7	99.5	100.0	99.7	99.7	99.5	99.5	99.7	99.5	98.7		99.9	99.7
EU513207	99.7	99.5	100.0	99.7	99.7	99.5	99.5	99.7	99.5	98.7	100.0		99.8
EU513208	99.2	99.0	99.5	99.2	99.2	99.0	99.0	99.2	99.0	98.2	99.5	99.5	

注:同表2

97.4%~97.5%,氨基酸的同源性只有96.9%(表4)。3型和7型北京地方株与其他毒株比较时氨基酸变异的位点集中(分别只有3个和1个)不同,这4株(包括日本的毒株)与其他毒株比较其氨基酸的变异位点较分散,有12个氨基酸的变异,分别在147、153、178、181、240、248、301、302、414、428、448、453位由H、T、V、E、T、Q、G、T、D、P、G、F变为R、N、I、K、N、P、E、S、N、S、R、S。

(2)基因进化树分析:3株北京ADV3分离株H9049(EU513211)、F1721(EU513209)和F2279(EU513210)与2005年广州分离株(AY878716)亲缘关系最近,而与其他国家(韩国、美国、瑞士)毒株亲缘性相对较远(图1);3株ADV7北京分离株F379(EU513205)、F762(EU513207)和F893(EU513208)与1998年日本分离株(AF053086)的亲缘关系最近(图2);3株ADV11北京分离株F311(EU513203)、F358(EU513204)、F454(EU513206)与2004年日本分离株(AB162772)的亲缘关系最近(图3)。

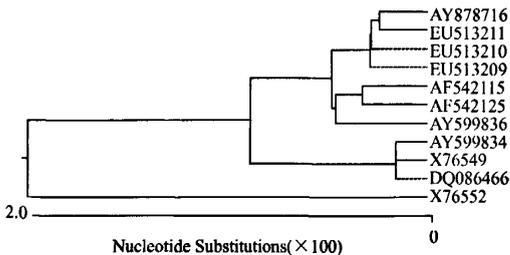


图1 ADV3 部分六邻体基因亲缘性系统发生树

讨 论

使用B组ADV3、7、11、21型六邻体基因引物对2006年61株ADV分离株分型发现,当年在北京地区引起呼吸道感染的以3型ADV为主,7型为辅,11型

较为罕见,未发现21型。

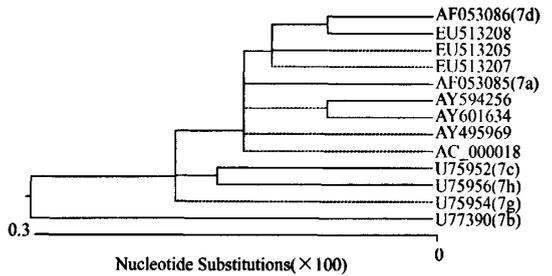


图2 ADV7 部分六邻体基因亲缘性系统发生树

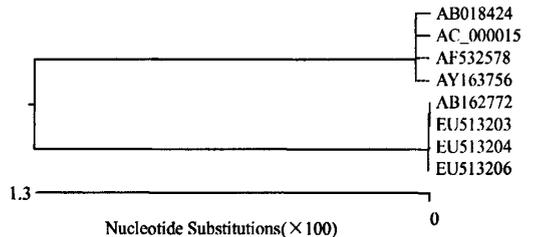


图3 ADV11 部分六邻体基因亲缘性系统发生树

通过对9株ADV北京分离株部分六邻体基因的扩增和序列分析发现,3、7和11型ADV北京分离株与其他序列比较虽然有着较高的同源性,但是还是有一定的核苷酸和氨基酸变异,而北京分离株之间的同源性较高。

ADV3六邻体由2835个碱基组成,比较11株ADV3六邻体第430~1618位的1189个核苷酸及推导出的396个氨基酸,3株北京ADV3分离株H9049(EU513211)、F1721(EU513209)和F2279(EU513210)与2005年广州的分离株(AY878716)亲缘关系最近,而与韩国、美国、瑞士、德国毒株比较其氨基酸的变异位点主要有3个,分别位于六邻体的第418、429和439位氨基酸,分别由T、T、A变为R、A、D。

表4 ADV11 部分六邻体基因核苷酸和氨基酸的同源性分析

编号	AC_000015	AB018424	AB162772	AF532578	AY163756	EU513203	EU513204	EU513206
AC_000015		99.9	97.5	100.0	100.0	97.5	97.5	97.5
AB018424	99.7		97.4	99.9	99.9	97.4	97.4	97.4
AB162772	98.9	96.6		97.5	97.5	100.0	100.0	100.0
AF532578	100.0	99.7	96.9		100.0	97.5	97.5	97.5
AY163756	100.0	99.7	96.9	100.0		97.5	97.5	97.5
EU513203	96.9	96.9	100.0	96.9	96.9		100.0	100.0
EU513204	96.9	96.9	100.0	96.9	96.9	100.0		100.0
EU513206	96.9	96.9	100.0	96.9	96.9	100.0	100.0	

注:同表 2

ADV7 六邻体由 2805 个碱基组成,比较 13 株 ADV7 六邻体第 432~1581 位的 1150 个核苷酸及推导出的 383 个氨基酸,3 株 ADV7 北京分离株 F379 (EU513205)、F762 (EU513207) 和 F893 (EU513208) 与 1998 年日本分离株 (AF053086) 的亲缘关系最近,同源性在 99.8%~100.0%; 而与其他分离年代较近的毒株 (包括中国 2004 年的毒株) 的同源性却相对较远,这是一个十分有趣的现象,比较其氨基酸的变异位点主要有 1 个,位于六邻体的第 443 位,由 L 变为 Q。

ADV11 六邻体由 2845 个碱基组成,比较 8 株 ADV11 六邻体第 432~1588 位的 1157 个核苷酸及推导出的 385 个氨基酸,3 株 ADV11 北京分离株 F311 (EU513203), F358 (EU513204), F454 (EU513206) 与 2004 年日本分离株 (AB162772) 的亲缘关系最近,它们的同源性达 100%。这 4 株与其他毒株比较有 12 个氨基酸的变异,我们发现在这 12 个变异中,有 3 个变为强碱性氨基酸 (K、R),1 个为强酸性氨基酸 (E),6 个为极性氨基酸 (N、S),2 个为非极性疏水性氨基酸 (I、P)。

有研究表明,ADV 六邻体是由基底的 P_1 、 P_2 区和塔区的 4 个环 ($L_1 \sim L_4$) 构成,基底区 P_1 、 P_2 是保守的,变化区主要集中在 $Loop_1$ 、 $Loop_2$ 上,其中包括 250 个变化的残基,存在有 7 个高变区 (HVR)^[9,10]。HVR₁~HVR₆ 出现在 $Loop_1$ 中,HVR₇ 在 $Loop_2$ 的塔尖。而这些高变区在不同血清型之间的长度有所不同^[11]。在 HVR₁、HVR₂、HVR₃、HVR₅ 和 HVR₇ 中都含有中和抗原决定簇的一部分,在这 5 个 HVR 区中包含大于 99% 的六邻体型特异性残基^[12]。

对 9 株北京分离株变异位点的分析发现,3 株 ADV3 的 3 个变异位点中,有 1 个位于 HVR₇ 区。3 株 ADV7 的 1 个变异位点位于 HVR₇ 区。3 株 ADV11 的 12 个变异位点中,有 4 个位于 HVR₁ 区,2 个位于 HVR₇ 区。

我们的研究提示,与 3 型和 7 型相比,11 型 ADV 的变异最大,其次是 3 型 ADV,而 7 型 ADV 的变异较小。变异多发生在 HVR₁ 区和 HVR₇ 区。ADV3 和 ADV7 是引起儿童肺炎的主要型别,关于它们的报道很多,而对 ADV11 的报道很少,我们也只检测到 3 株,今后还需积累更多的资料作进一步研究。

参 考 文 献

- [1] 朱汝南,邓洁,王芳,等. 2000 年秋冬季至 2002 年夏北京地区急性呼吸道感染病毒病原学研究. 临床儿科杂志,2003,21(1): 25-28.
- [2] Noda M, Tetsuya Y, Takemasa S, et al. Molecular and epidemiological analyses of human adenovirus type 7 strains isolated from the 1995 nationwide outbreak in Japan. J Clin Microbiol, 2002, 40: 140-145.
- [3] Bruzzone MS, Fuentes L, Spencer E. Specific subgroup B adenovirus diagnosis by PCR of the fibre gene. J Infect, 2000, 40: 154-159.
- [4] Carballal G, Videla C, Espinosa M, et al. Multi-centered study of viral acute lower respiratory infections in children from four cities of Argentina, 1993-1994. J Med Virol, 2001, 64(2): 164-167.
- [5] Fujimoto T, Chikahira M, Kase T, et al. Single-type multiplex PCR for rapid and sensitive diagnosis of subgenus B and other subgenera adenoviruses in clinical samples. Microbiol Immunol, 2000, 44(10): 821-826.
- [6] 邓洁,钱渊,朱汝南,等. 巢式-多重聚合酶链反应在腺病毒检测及分型中的应用. 中华儿科杂志, 2007, 28(8): 781-784.
- [7] Xu WH, Erdman DD. Type-specific identification of human adenovirus 3, 7, and 21 by a multiplex PCR assay. J Med Virol, 2001, 64: 537-542.
- [8] 唐浏英,刘秀云,卢起,等. 2004 年冬至 2005 年春引起北京地区儿童肺炎的腺病毒基因特点分析. 病毒学报, 2006, 22(4): 286-291.
- [9] Li QG, Wadell G. Genetic variability of hexon loops 1 and 2 between seven genome type of adenovirus serotype 7. Arch Virol, 1999, 144(9): 1739-1749.
- [10] Crawford-Miksa L, Schnurr DP. Analysis of 15 adenovirus hexon proteins reveals the location and structure of seven hypervariable regions containing serotype-specific residues. J Virol, 1996, 70: 1836-1844.
- [11] Lu X, Erdman DD. Molecular typing of human adenoviruses by PCR and sequencing of a partial region of the hexon gene. Arch Virol, 2006, 151: 1587-1602.
- [12] 金玉霞. 腺病毒六邻体蛋白的免疫学研究进展. 国外医学免疫学分册, 2002, 25(4): 172-174.

(收稿日期:2008-05-26)

(本文编辑:张林东)