

应用膜抗原荧光抗体试验检测人群水痘-带状疱疹病毒血清抗体阳性率

刘静静 王明丽 甘霖 廖伟娇 陈敬贤

【摘要】 目的 应用膜抗原荧光抗体试验(FAMA)方法调查广州地区正常人群水痘-带状疱疹病毒(VZV)的流行现状。方法 采用以VZV感染细胞作为抗原、异硫氰酸荧光素(FITC)标记的羊抗人IgG作为二抗的FAMA试验,对随机抽取的592份正常人血清标本进行特异性VZV抗体检测。结果 FAMA试验检测VZV抗体与其他的疱疹类病毒的相应抗体不产生交叉反应。应用此法检测592份血清标本中,VZV抗体总体阳性率为76.52%;1~、4~、7~、14~、20~、30~、40~及≥50岁年龄组血清抗体阳性率分别是14.67%、51.56%、73.91%、91.26%、92.78%、95.65%、98.11%和100%。1~3岁年龄组血清抗体阳性率最低,血清抗体阳性率随年龄的增大而升高;不同性别间阳性率差异无统计学意义($P>0.005$),不同年龄组间阳性率差异有统计学意义($P<0.001$)。结论 采用FAMA法检测人群中VZV抗体与其他疱疹类病毒的相应抗体不产生交叉反应,是VZV抗体检测的可靠方法。应以1~3岁儿童为VZV疫苗免疫的首选对象。

【关键词】 水痘-带状疱疹病毒;膜抗原荧光抗体试验;血清抗体阳性率

Seroepidemiology of varicella-zoster virus infection measured by the fluorescent antibody to membrane antigen test LIU Jing-jing*, WANG Ming-li, GAN Lin, LIAO Wei-jiao, CHEN Jason.
*Department of Microbiology, Anhui Medical University, Hefei 230032, China
Corresponding author: CHEN Jason, Email: jc28@columbia.edu

【Abstract】 Objective Adopting serology assay-fluorescent antibody to membrane antigen (FAMA) as "gold standard", sero-prevalence status of varicella-zoster virus (VZV) infection was investigated, in Guangzhou. Methods FAMA test was established with VZV infected human embryo fibroblasts as antigens and fluorescein isothiocyanate(FITC) labeled goat anti-human IgG as the secondary antibody. Sensitivity and specificity of the assay were evaluated. The sero-prevalence of anti-VZV IgG in 592 serum specimens randomly collected from a clinical laboratory, was analyzed with FAMA. Results Data from FAMA test showed no cross-reaction with other Herpesviruses when it was used to detect VZV antibodies. The overall prevalence of VZV antibody was 76.52%. Age-specific prevalence rates of VZV antibody in different age groups as: 1-3, 4-6, 7-13, 14-19, 20-29, 30-39, 40-49, ≥50, were found to be 14.67%, 51.56%, 73.91%, 91.26%, 92.78%, 95.65%, 98.11% and 100%, respectively. The sero-prevalence of 1-3 age group appeared the lowest but rose sharply with the increase of age but showing no association with gender. Conclusion Our data indicated that VZV infection occurred in early childhood, in Guangzhou, suggesting that the primary recipients of VZV vaccine should be under the 1-3 age group. Additional subjects for vaccination would be children above 3 years old with no history of VZV infection, and serology test negative for VZV. The assay was validated by its excellent specificity and could be used as the first choice in the detection of protective antibodies against VZV infection.

【Key words】 Varicella-zoster virus; Fluorescent antibody to membrane antigen; Sero-prevalence

水痘-带状疱疹病毒(VZV)为双链DNA病毒,属疱疹病毒 α 亚科。人类对VZV普遍易感,原发感染可引起水痘,病死率在7%~28%之间^[1]。成年人

罹患水痘并不常见,孕妇若在分娩前5天或产后48小时内罹患水痘,可能引起围产期水痘,婴儿的病死率高达30%^[2]。目前认为VZV只有一个血清型,病后可以产生持久的免疫力。用血清学方法检测VZV抗体对于易感人群的确定和鉴别、水痘疫苗免疫策略的研究以及疫苗免疫效果的评价具有重要意义。膜抗原荧光抗体试验(FAMA)检测法是目前被公认为能够反映VZV免疫状态的最为可靠的试验

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2009.04.016

基金项目:国家自然科学基金(30872253)

作者单位:230032 合肥,安徽医科大学微生物学教研室(刘静静、王明丽、甘霖、陈敬贤);广州医学院第一附属医院检验科(廖伟娇)

通信作者:陈敬贤,Email: jc28@columbia.edu

方法,它不仅具有很好的反应敏感性和特异性,与其他疱疹类病毒不存在交叉反应^[3],而且能够较好地反映体内的保护性抗体水平^[4]。本研究应用 FAMA 技术对广州市部分人群的 VZV 抗体水平进行检测,以了解当地 VZV 感染的流行状况。

材料与方 法

1. 细胞与病毒:人胚成纤维细胞(Human embryo fibroblast, HF)为本实验室制备与保存;VZV 疫苗亲本毒株(p-Oka)由美国哥伦比亚大学附属儿童医院的 Anne Gershon 教授惠赠。

2. 试剂与仪器:异硫氰酸荧光素(FITC)标记的山羊抗人 IgG(H+L)购自 Beyotime 公司,人抗 VZV-IgG 标准品(5 IU)购自 NIBSC,荧光显微镜为 OLMPUS 公司产品。

3. 血清标本:2008 年 5 月从广州医学院第一附属医院检验科所保存的 3557 份体检血清标本中采取编号随机数字的方法随机抽取 592 份血清,-75℃ 保存待检。阴性对照血清由本室从自然人群中筛选与保存。交叉反应对照为本实验室用 HSV、HCMV 全病毒免疫家兔制备的抗血清。

4. 病毒感染细胞的制备:用 p-Oka 病毒株感染长成单层的 HF 细胞,5% CO₂ 孵箱中 37℃ 培养 2~3 d,待细胞病变达 80%~90%时,用 0.01 mol PBS(pH 值 7.2)洗 1 次,然后用无菌细胞刮刮取细胞。将刮下的 VZV 感染 HF 细胞连同培养液一起转移至 50 ml 离心管中,室温下 1000×g 离心 10 min。弃上清,用 PBS 重悬细胞沉淀并计数。调整细胞浓度至 1×10⁵/ml 备用。

5. FAMA 试验:操作步骤和结果判断按照哥伦比亚大学 Anne Gershon 教授实验室的具体方法(Gershon AA: Personal communication, 2007)。将待检血清和对照血清用 0.01 mol PBS(pH 值 7.2)进行 2 倍系列稀释(1:2~1:64),用 PBS 作空白对照,以本室保存的阴性血清作阴性对照,以人抗 VZV-IgG 标准品作为阳性对照,以 HSV 或 HCMV 全病毒免疫的兔血清作为交叉反应对照。取 25 μl 不同稀释度的血清样品加至 96 孔 U 型底 PVC 板中,然后每孔加入 25 μl VZV 感染的 HF 细胞(1×10⁵ 细胞/ml),置湿盒中室温孵育 30 min。取出后每孔加入 150 μl PBS 并混匀,4℃ 1000×g 离心 10 min,轻甩 96 孔板弃去上清。每孔加 125 μl PBS 洗涤细胞,4℃ 1000×g 离心 10 min,轻甩 96 孔板弃去上清,重复洗板 1 次。然后每孔加入 25 μl 用含有 0.01% 伊文斯蓝的 PBS 以

1:500 稀释的 FITC 标记山羊抗人 IgG(H+L)(交叉反应对照孔中加入 1:500 稀释的 FITC 标记山羊抗兔 IgG),轻轻振动 96 孔板使得沉淀细胞与二抗混匀,置湿盒中于室温孵育 30 min。4℃ 1000×g 离心 10 min 以后,轻甩 96 孔板弃去上清,如上述用 PBS 洗板 2 次,弃去孔中液体。每孔加入 25 μl 90% 的甘油 PBS 溶液重悬细胞,取 10 μl 重悬细胞滴加在载玻片上,覆盖盖玻片以后在荧光显微镜下观察结果。

6. 统计学分析:所有资料经 SAS 系统建立数据库并进行统计分析,采用校正 χ^2 检验、Fisher's 精确概率法、CMH 法对不同性别和年龄组间 VZV 抗体阳性率进行统计学分析。

结 果

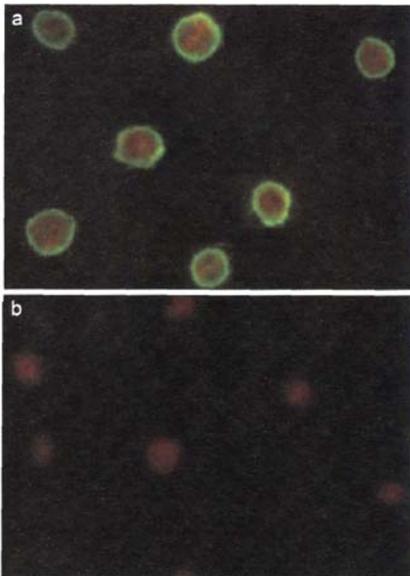
1. FAMA 试验结果观察与判定:由于与 VZV 致病性和免疫原性相关并具有中和抗原表位的病毒糖蛋白充分表达于病毒囊膜和受感染细胞的细胞膜上,因此 FAMA 试验中所形成的抗原抗体复合物主要位于感染细胞表面,形成完整的黄绿色荧光环。本实验中采用 0.01% 伊文斯蓝衬染以便于观察结果。感染细胞边缘出现完整的黄绿色荧光环且背景为红色者判为阳性(图 1a);细胞边缘未出现完整的黄绿色荧光环,仅见红色背景者判为阴性(图 1b)。待检血清 1:2 稀释为抗体阳性判断的临界值。值得注意的是,由于 VZV 感染的普遍性,如图 1b 中所见完全没有荧光的现象十分少见。更常见的是在细胞的中间或胞核、或者在细胞碎片上见到荧光,这些都不能判为阳性。

实验结果显示,阳性对照组(人抗 VZV-IgG 标准品)在感染细胞边缘出现完整的黄绿色荧光环且背景为红色判定为阳性(图 1a);阴性对照和空白对照仅见暗红色的细胞,未见细胞边缘完整的黄绿色荧光环。交叉反应对照(兔抗 HSV 或 HCMV 免疫血清)组亦呈阴性结果,仅见暗红色的细胞,说明 FAMA 试验与 HSV、HCMV 无交叉反应。

2. 不同年龄组人群血清中 VZV 抗体阳性率:592 份血清中 VZV 抗体总阳性率为 76.52%。按年龄分组统计,可见阳性率随年龄的增长呈上升趋势。1~、4~、7~、14~、20~、30~、40~、≥50 岁组 VZV 抗体总阳性率分别为 14.67%、51.56%、73.91%、91.26%、92.78%、95.65%、98.11%、100%(表 1,图 2)。经 CMH 法分析,不同性别间 VZV 抗体阳性率差异无统计学意义($P>0.005$),各年龄组间 VZV 抗体阳性率差异有统计学意义($P<0.001$);见表 2。

表 1 广州市人群中不同年龄组 VZV 血清抗体阳性率(%)

年龄组 (岁)	男 性			女 性			合 计		
	检测数	阳性数	阳性率	检测数	阳性数	阳性率	检测数	阳性数	阳性率
1~	47	7	14.89	28	4	14.29	75	11	14.67
4~	29	14	48.27	35	19	54.29	64	33	51.56
7~	51	39	76.47	41	29	70.73	92	68	73.91
14~	56	52	92.86	47	42	89.36	103	94	91.26
20~	48	44	91.67	49	46	93.88	97	90	92.78
30~	38	37	97.37	31	29	93.55	69	66	95.65
40~	29	29	100.00	24	23	95.83	53	52	98.11
≥50	18	18	100.00	21	21	100.00	39	39	100.00
合计	316	240	75.95	276	213	77.17	592	453	76.52



注: a: FAMA 试验阳性; b: FAMA 试验阴性

图 1 FAMA 试验检测人血清标本中 VZV 抗体结果

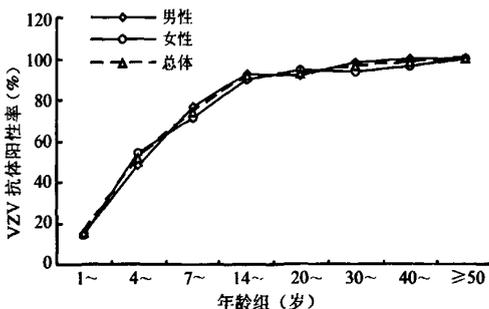


图 2 广州市健康人群中不同年龄组 VZV 抗体流行趋势

讨 论

用血清学方法检测 VZV 抗体对于易感人群的确定和鉴别、水痘疫苗免疫策略的研究以及疫苗免疫效果的评价具有重要意义。迄今已经用来检测

表 2 广州市人群中不同年龄组 VZV 血清抗体阳性率比较

年龄组(岁)	男性	女性	合计	χ^2 值	P值
1~	7(14.89)	4(14.29)	11(14.67)	0.0000	1.0000*
4~	14(48.27)	19(54.29)	33(51.56)	0.2293	0.6320
7~	39(76.47)	29(70.73)	68(73.91)	0.3882	0.5332
14~	52(92.86)	42(89.36)	94(91.26)	0.0759	0.7830*
20~	44(91.67)	46(93.88)	90(92.78)	0.0008	0.9774*
30~	37(97.37)	29(93.55)	66(95.65)	0.0326	0.8567
40~	29(100.00)	23(95.83)	52(98.11)		0.4528*
≥50	18(100.00)	21(100.00)	39(100.00)		
合计	240(75.95)	453(76.52)		0.2644	0.6071*

注:括号外数据为 VZV 抗体的阳性例数,括号内数据为阳性率(%);*采用校正 χ^2 检验;†采用 Fisher's 精确概率法;‡采用 CMH 法;不同年龄段间 VZV 抗体阳性率比较(R×C 法):男性 $\chi^2=147.7671, P<0.001$;女性 $\chi^2=101.6348, P<0.001$;总人群 $\chi^2=247.5669, P<0.001$ (CMH 法)

VZV 抗体的试验包括补体结合试验(CF)、抗补体免疫荧光抗体试验(CIFA)、中和试验(N)、间接免疫凝集试验(IHA)、免疫黏附凝集试验(IAHA)、放射免疫测定(RIA)、乳胶凝集试验(LA)以及用纯化的病毒糖蛋白作为抗原的 gpELISA 等^[5,6],但是它们均存在一些缺陷,如 CF 的敏感性不高^[6];ELISA 法易受干扰因而缺乏良好的敏感性和特异性^[7]。有研究显示,在 ELISA 检测为阴性的标本中用 FAMA 重新检测仍有 15% 为阳性^[8];gpELISA、RIA 和 LA 等虽然具有良好的敏感性和特异性,但是其结果与机体对 VZV 感染的免疫状态有时不相吻合^[5],这是因为虽然经过多年的研究,针对 VZV 感染的保护性抗体的组成还不十分清楚。国外研究已表明,FAMA 法检测 VZV 抗体敏感性好、特异性高、结果易判定、重复性好等优点,且未发现与其他疱疹病毒感染产生交叉反应。更重要的是,该实验结果能够最好地反映被检血清中是否含有针对 VZV 的保护性抗体,所以该法一直被认为是了解 VZV 免疫状态的“金标准”^[3,4,9]。

FAMA 技术为检测人群对水痘的免疫力提供

了较为准确的血清学方法,它只需要少量的血清(10 μl)就可以进行检测,同时还可以在微孔板上进行大量标本的高通量操作。本实验中以人抗 VZV-IgG 标准品为阳性对照,从自然人群中筛选与保存的血清为阴性对照,以 PBS 为空白对照进行了多次重复试验,均得到相同的结果;并发现阳性和阴性结果在荧光显微镜下容易确认,因而可以将荧光观察中因主观原因造成的误判降低到最小程度,保证了试验结果的重复性与准确性。

水痘虽然是一个世界性的传染性疾病,但是它的流行病学特点会随着地理位置的改变而有所不同^[10]。有研究表明,新加坡 VZV 抗体年龄别流行率 0~4 岁为 4.0%,5~14 岁为 21.0%,15~24 岁为 41.0%,≥45 岁可达到 98.0%^[11];在马来西亚、泰国和印度 15 岁以上人群的血清抗体阳性率为 50.0%~57.0%^[12]。但是在英国到 3 岁时超过半数的儿童已经感染了 VZV,15 岁时血清阳性率已经高于 90.0%^[13];西班牙的研究显示,在 10~14 岁的人群中血清阳性率为 92.0%^[13]。这些数据表明,VZV 抗体年龄别流行率在温带和热带国家是有差别的。一般而言,温带地区 15 岁时 90.0% 的儿童已经有了 VZV 抗体,而在热带地区相同年龄段只有约半数的儿童感染过 VZV。由于不同国家和地区水痘的流行病学特点可能不同,因此为了科学地制定疫苗免疫计划,了解本地区 VZV 的血清流行病学特点是非常重要的。

在本次研究中运用 FAMA 技术检测 592 份不同年龄组人血清标本,其中阳性标本 453 份,阳性率为 76.52%。由于新生儿血清中通常带有来自母体的抗体,这些抗体不能反映 VZV 自然感染的情况,且大约在 6 个月以后逐渐消失,因此本研究没有将 1 岁以下的儿童纳入分析。从图 2 中可以看出 1~19 岁血清阳性率从 14.89% 迅速上升到 92.86%,而 19~40 岁血清阳性率逐渐达到 100%;从感染趋势上看,随着年龄的增长,人群 VZV 抗体阳性率呈上升趋势,且 VZV 抗体年龄别流行率上升速度是相似的;从性别上看两者差异无统计学意义。这一结果与我国其他省市的人群 VZV 抗体阳性率相一致^[14-18]。国外温带地区国家的情况也很类似,例如意大利 20~39 岁的人群中 VZV 血清阳性率达到 91.8%^[19];美国 0~4 岁组抗体阳性率为 18.0%,5~9 岁为 59.0%,10~14 岁为 88.0%,≥15 岁为 100%^[20];法国 8 岁以上儿童抗体阳性率 >82%,18 岁以上 >90.0%^[10];沙特阿拉伯 <2 岁组为 46.0%,1~5 岁为 51.0%,6~9 岁为

74.0%,>30 岁为 91.0%^[21]。

疫苗是预防和控制 VZV 流行最有效的手段。在美国从 1995 年开始,水痘减毒活疫苗被批准用于预防水痘感染,10 多年间儿童中水痘发病率和死亡率显著降低^[22]。本次调查结果显示,1~3 岁组有 85.33% 的儿童为 VZV 易感者,因此应以 1~3 岁儿童为疫苗接种的首选对象。4~6 岁、7~13 岁儿童已有 51.56% 和 73.91% 受到感染,宜选择没有水痘史的儿童作为免疫对象。1 岁以下的儿童常常还含有来自母体的 VZV 抗体,因而没有列入本研究。Eugene^[23]指出,在接种 VZV 疫苗后血清阳转率为 97.0%,但在第二年即降低至 86.0%,在随后的 6 年中 VZV 抗体便会逐渐降低到不易检出的水平。因此提出在青春期前再加强免疫一次,可以减少成年人中易感个体的比例,提高人群免疫力,有效地预防水痘的流行。另外,也有报道指出,在疫苗接种覆盖率不完全的地区,儿童中水痘的发病率虽然显著下降了,但是首次感染 VZV 的年龄增大了^[24],这使得在军队、大学校园等年轻人聚集的地方预防水痘变得更加重要。

本次研究表明,广州虽然地处亚热带,但 VZV 感染情况与温带地区大体一致。由于大多数 VZV 的感染都发生在学龄前到小学这段时期,因此在 1~3 岁时普遍接种疫苗可以减少水痘的发病率,并大大降低野毒株在人群中的传播。若能在青春期前加强免疫一次,既能进一步增加疫苗接种覆盖率,又可以减少成年人中的易感个体比例,将会有助于 VZV 感染的预防。

参 考 文 献

- [1] Feldman S, Lott L. Varicella in children with cancer: impact of antiviral therapy and prophylaxis. *Pediatrics*, 1987, 80(4): 465-472.
- [2] Enders G, Miller E, Cradock-Watson J, et al. Consequences of varicella and herpes zoster in pregnancy prospective study of 1739 cases. *Lancet*, 1994, 343(8912): 1548-1551.
- [3] Williams V, Gershon A, Brunell PA. Serologic response to varicella-zoster membrane antigens measured by direct immunofluorescence. *J Infect Dis*, 1974, 130(6): 669-672.
- [4] Gershon A, Chen J, LeRussa P, et al. Varicella Zoster Virus. In *Manual of Clinical Microbiology*, 9th Ed., American Society of Microbiology Press, Washington DC, 2007.
- [5] 王敏力,沈琦. 水痘-带状疱疹免疫球蛋白研究进展. *中国生物制品学杂志*, 2007, 9: 701-704.
- [6] Wreghitt TG, Tedder RS, Nagington J, et al. Antibody assays for varicella virus: comparison of competitive enzyme linked

- immunosorbent assay (ELISA), competitive radioimmunoassay (RIA), complement fixation, and indirect immuno-fluorescence assays. *J Med Virol*, 1984, 13(4):361-370.
- [7] Sauerbrei A, Wutzler P. Serological detection of varicella-zoster virus-specific immunoglobulin G by an enzyme linked immunosorbent assay using glycoprotein antigen. *J Clin Microbiol*, 2006, 44(9): 3094-3097.
- [8] Heininger U, Braun-Fahrlander C, Desgrandchamps D, et al. Seroprevalence of varicella-zoster virus immunoglobulin G antibodies in Swiss adolescents and risk factor analysis for seronegativity. *Pediatr Infect Dis J*, 2001, 20(8):775-778.
- [9] Zaia JA, Oxman MN. Antibody to varicella-zoster virus-induced membrane antigen: immunofluorescence assay using monodispersed glutaraldehyde-fixed target cells. *J Infect Dis*, 1977, 136(4):519-530.
- [10] Khoshnood B, Debruyne M, Lancon F, et al. Sero-prevalence of varicella in the French population. *Pediatr Infect Dis J*, 2006, 25(1): 41-44.
- [11] Ooi PL, Goh KT, Doraisingham S, et al. Prevalence of varicella-zoster virus infection on Singapore. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*, 1992, 23(1):22-25.
- [12] Lee BW. Review of varicella zoster sero-epidemiology in India and Southeast Asia. *Trop Med Intern Health*, 1998, 3(11): 886-890.
- [13] Salleras L, Dominguez A, Vidal J, et al. Seroepidemiology of varicella-zoster virus infection in Catalonia (Spain). Rationale for universal vaccination programme. *Vaccine*, 2000, 19(2-3): 183-188.
- [14] 王雅妮. 深圳市健康人群水痘-带状疱疹病毒血清流行病学调查. *中国热带医学*, 2006, 6(7):1009-1012.
- [15] 曹惠霖, 杜军, 贾志远, 等. 我国部分地区人群水痘-带状疱疹病毒流行率. *中国计划免疫*, 1998, 4(1):38-40.
- [16] 周铁群, 王剑锋, 邱平, 等. 儿童水痘血清流行率调查及其疫苗免疫效果. *中华流行病学杂志*, 1998, 19(5):271-273.
- [17] 王稳, 刘丹, 李德钧. 4城市人群水痘-带状疱疹病毒抗体阳性率调查. *预防医学情报杂志*, 2004, 20(2):155-156.
- [18] 潘伟毅, 张向东. 福建省健康人群水痘-带状疱疹病毒血清流行病学调查. *实用预防医学*, 2003, 10(6):864-865.
- [19] Gabutti G, Penna C, Rossi M, et al. The seroepidemiology of varicella in Italy. *Epidemiol and Infect*, 2001, 126(3):433-440.
- [20] Rosaleen M, Carmella N, Soheil N, et al. Seroepidemiology of varicella. *J Infect Dis*, 1996, 153(1):153.
- [21] Hossain A. Herpes simplex virus 1 (HSV-1) and varicella-zoster virus (VZV) infections in Saudi Arabia. *J Trop Pediatr*, 1989, 35(4):171-174.
- [22] Reynolds MA, Chaves SS, Harpaz R, et al. The impact of the varicella vaccination program on herpes zoster epidemiology in the United States: a review. *J Infect Dis*, 2008, 197 Suppl 2: S224-227.
- [23] Shapiro ED. Second dose of varicella vaccine for children: are we giving it too late. *J Infect Dis*, 2008, 197(7):935-937.
- [24] Gershon AA, Takahashi M, White CJO. *Varicella vaccine/Platkin SA, Orenstein WA. Vaccines. 3rd ed. Philadelphia: Saunders, 1999:475-507.*

(收稿日期:2008-09-03)

(本文编辑:尹廉)

- 征稿通知 -

第十届全国流行病学专业学术会议征文

为进一步加强全军流行病学专业学术交流,掌握流行病学国内外最新研究进展,推动全军流行病学学科不断发展,全军流行病学专业委员会定于2009年9月在青海省西宁市召开“第十届全国流行病学专业学术会议”,会议由军事医学科学院微生物流行病学研究所病原微生物生物安全国家重点实验室承办。会议届时将邀请军内外知名流行病学专家作专题报告。为更好开展学术交流,现公开征集会议论文。会议热忱欢迎流行病学研究领域的专家和从事相关工作的同道踊跃投稿,积极参会交流。

1. 征文内容: 流行病学研究最新进展;新/突发传染病流行病学;新/突发传染病的监测、实验室诊断、病原检测、鉴定、预防及防护等;新技术、新方法在流行病学研究中的应用;媒介生物控制及防治研究。2. 征文要求:(1)未公开发表的论文或论文摘要(论文限5000字以内,摘要限400字);(2)文稿全文采用word文本,来稿以A4纸打印一份,请注明作者和联系地址(含所属单位、电话、Email),来稿请注明“全军流病会征文”,同时请提交电子版文档;纸质稿件请寄:100071北京市丰台区东大街20号五所科技处韩晓娜收,电子投稿:hanxn929@126.com 联系电话/传真:010-63897954;(3)来稿请附单位论文投稿介绍信;(4)征文截止日期:2009年5月31日。