

# 浙江省 2005—2010 年风疹病毒分子流行病学研究

冯燕 钟淑玲 徐昌平 史雯 卢亦愚

**【摘要】** 目的 分析 2005—2010 年浙江省风疹病毒流行株的病原学与分子流行病学特征。

**方法** 采集该期间风疹疫情中的疑似患者标本,于 Vero 细胞上分离病毒。采用巢式 RT-PCR 扩增流行株 E1、E2 和 C 三个结构基因片段,对扩增产物进行序列测定与分析。**结果** 从 52 例临床标本中共分离到风疹病毒流行株 7 株,除 RVi/Zhejiang.CHN/23.08 株为 2B 基因型外,其余 6 株均属于 1E 基因型。基因进化树上,1E 基因型流行株分别与香港、海南地区流行株具有最近亲缘关系,而 2B 基因型流行株与 BuenosAires.ARG/46.08 位于同一分支。遗传距离分析表明,浙江 2B 型流行株与全球其他地区流行株间的遗传距离(0.011)小于与中国流行株(0.023)间的遗传距离。浙江风疹病毒流行株与中国风疹疫苗株 BRD II 在核苷酸水平上的同源性与氨基酸水平上的同源性为 E1>C>E2,对应存在 3、11 和 23 个氨基酸的变异。各位点氨基酸熵值表明,E1 蛋白上仅存在一个易变位点(熵值>0.600),而 E2 蛋白上有 7 个易变位点和 1 个高变位点(熵值>1.000)。**结论** 2005—2010 年浙江省存在两种基因型风疹病毒流行,1E 为优势基因型,2B 可能为境外输入株。流行株 E1 基因氨基酸序列相对保守,而 E2 基因氨基酸变异较大,在风疹病毒流行病学监测中除关注 E1 基因外,应开展对结构基因 E2 和 C 的研究。

**【关键词】** 风疹病毒; 分子流行病学; 熵值; 遗传距离

**Molecular epidemiological study on rubella virus strains isolated in Zhejiang province, China, 2005–2010** FENG Yan<sup>1</sup>, ZHONG Shu-ling<sup>2</sup>, XU Chang-ping<sup>2</sup>, SHI Wen<sup>1</sup>, LU Yi-yu<sup>2</sup>. 1 Department of Lab Science and Life Science, Wenzhou Medical College, Wenzhou 325035, China; 2 Virus Institute of Zhejiang Provincial Centre for Disease Control and Prevention

Corresponding author: LU Yi-yu, Email: luyiyuzjh@yahoo.com.cn

This work was supported by grants from the Zhejiang Provincial Natural Science Foundation (No. Y206307, No. Y2091178).

**【Abstract】** **Objective** To analyze the molecular epidemiological characteristic of rubella virus strains isolated in Zhejiang province from 2005 to 2010, to provide basic data for rubella prevention and control. **Methods** Rubella virus strains were isolated on Vero cells from the suspected patients' specimens collected in Zhejiang province during 2005 to 2010. Partial fragments of the structural gene of Zhejiang rubella strains were amplified, using nested reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). The amplified products were sequenced and analyzed. **Results** In total, 7 rubella strains were isolated from 52 clinical specimens, of which six were classified as genotype 1E and only one was characterized as genotype 2B. In the phylogenetic tree, the Zhejiang 1E genotype rubella strains were located in the same branches with Hongkong or Hainan isolates respectively, but the Zhejiang 2B genotype strain were located in the same branch with oversea strain BuenosAires.ARG/46.08. Through p-distance analysis, results also showed that the Zhejiang 2B genotype strain was closer to the 2B strains isolated from overseas (0.011) than those strains from other provinces of China (0.023). Compared with Chinese vaccine strain BRD II, the homology on three structural genes was C>E2>E1, but the homology of deduced amino acid sequence was E1>C>E2, with corresponding 3, 11 and 23 amino acid mutations. There was only one amino acid on E1 gene with entropy value higher than 0.600, but seven sites on E2 gene with entropy

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2011.09.015

基金项目:浙江省自然科学基金(Y206307, Y2091178)

作者单位:325035 温州医学院检验医学院与生命科学院(冯燕);浙江省疾病预防控制中心病毒所 浙江省公共卫生应急检测关键技术重点实验室(钟淑玲、徐昌平、史雯、卢亦愚)

通信作者:卢亦愚, Email: luyiyuzjh@yahoo.com.cn

value appeared higher than 0.600 and one with entropy value higher than 1.000. **Conclusion** Two genotypes of rubella virus had circulated in Zhejiang province during 2005 to 2010. Genotype 1E appeared to be the predominant genotype and 2B being an imported one. Amino acid sequence of E1 gene from Zhejiang rubella strains was comparatively conserved, but E2 gene was hypervariable. Study on rubella virus E2 and C gene should be conducted in the epidemiological surveillance program of rubella.

**[Key words]** Rubella virus; Molecular epidemiology; Entropy value; Genetic(p)-distance

风疹是由风疹病毒引起的以发热、出疹为主要临床症状的呼吸道传染病,妊娠早期妇女感染风疹病毒可引起流产、死胎或新生儿先天性风疹综合征(CRS)<sup>[1,2]</sup>。虽然,风疹疫苗的使用大大降低了发达国家的风疹发病率,CRS也基本得到阻断,但据WHO估计,发展中国家每年CRS的发生率仍超过10万例,增加了社会和经济负担<sup>[2]</sup>。目前,WHO要求将风疹和CRS也纳入实验室监测网络,同时已在美洲区和欧洲区确立2010年消除风疹和CRS的目标<sup>[3,4]</sup>。风疹的实验室监测,尤其是对流行株的病原学和分子流行病学监测将为鉴定传染源、追踪传播途径,掌握风疹流行株的抗原性,分析疫苗有效性等工作提供重要依据。本研究从2005—2010年浙江省风疹疫情中分离得到风疹病毒流行株,通过对流行株3个结构基因的序列测定,以及与相关风疹毒株的比较,研究浙江省风疹流行株的病原学与基因特征。

### 材料与方法

1. 材料:临床标本为2005—2010年浙江省风疹疫情中由丽水、温州等市疾病预防控制中心采集的52例疑似风疹患者含漱液/咽拭子标本。其中男性34例,女性18例;<10岁组10例,10~20岁组22例,>20岁组1例,年龄不详19例。患者发病集中在每年3~5月,病后3~5d内采集患者含漱液/咽拭子,于24h内冷藏送检。Vero细胞由国家麻疹实验室提供,本实验室传代至40代内。

#### 2. 方法:

(1)病毒分离:将0.2 ml患者含漱液/咽拭子接种于长成单层的Vero细胞,于35℃,5% CO<sub>2</sub>培养,同时做好阴性对照。每天观察pH值,并记录细胞病变(CEP),7d后收获培养物冻融2次,离心后取上清接种于新的单层Vero细胞,按上述方法盲传3代,收获培养物于-80℃保存。

(2)病毒RNA提取与鉴定:采用德国QIAGEN公司的Rneasy Mini Kit,对细胞培养物提取病毒RNA,按照试剂盒说明书进行。采用荧光定量RT-PCR对每代病毒分离株进行鉴定,荧光定量RT-PCR参照文献[5]。

(3)风疹病毒E1、E2和C基因核苷酸片段的扩增:采用巢式RT-PCR扩增风疹病毒流行株E1、E2和C基因。反转录(RT)采用Invitrogen公司M-MLV Reverse Transcriptase与随机引物Random 9进行,巢式PCR采用TaKaRa LA Taq with GC Buffer Kit。E1基因的扩增引物与方法见文献[6],E2和C基因的扩增引物由本实验室设计。

(4)序列测定与数据分析:扩增产物由南京金思特生物技术公司测序,并进行3次重复。获得的序列通过生物学软件DNAMAN拼接,并将E1、E2和C基因分别截取为739 nt(8731~9469)、846 nt(7412~8257)和854 nt(6512~7365)片段,进行序列比对;氨基酸推导和熵值的计算采用BioEdit Sequence Alignment Editor Software,系统树的构建采用DNASTAR软件,遗传距离分析应用Mega 3.1软件。

### 结 果

1. 浙江风疹流行株的分离及基因型别:共分离到7株流行株(表1)。病毒株在Vero细胞上均未产生特异性CPE,但盲传3代后细胞培养物荧光定量RT-PCR鉴定为风疹病毒核酸阳性,确定为风疹病毒株。该流行株与WHO推荐的13个基因型参考株E1基因739 nt序列构建基因进化树,结果表明6株浙江风疹流行株属1E基因型,而RVi/Zhejiang.CHN/23.08株与参考株RVI/WA.USA/16.00位于同一分支,属2B基因型(图1)。

2. 浙江省1E基因型风疹流行株的亲缘关系:对浙江1E型流行株与疫苗株、型内参考株,GenBank上39株中国1E型流行株以及全球其他地区72株1E型流行株进行组内和组间遗传距离计算(表2)。浙江1E型流行株组内遗传距离与我国其他地区流行株组内遗传距离均为0.015,浙江流行株与中国流行株接近,其组间遗传距离小于与全球其他地区流行株(0.020)以及WHO参考株(0.019)间的遗传距离。

以浙江1E型流行株与我国其他省份1E型流行株E1基因构建系统进化树,结果表明浙江省各年1E型流行株位于进化树上多个分支,无明显的时间序列。2007年分离株与海南2007年分离株RVi/

表 1 浙江省风疹病毒流行株的标准命名、来源、基因测序与登录信息

年份	标本份数	分离株编号	标准命名	年龄(岁)	性别	分离年份	标本类型	标本来源	病毒鉴定		基因扩增			E1 基因 GenBank 登录号	
									CPE	Real-time RT-PCR	E1	E2	C		
2005	27	ZJ05-1	RVi/Zhejiang.CHN/15.05	16	男	2005	含漱液	衢州	-	+	+	+	+	1E	GQ374567
		ZJ05-2	RVi/Zhejiang.CHN/17.05	18	女	2005	含漱液	丽水	-	+	+	+	+	1E	GQ374568
2007	13	ZJ07-1	RVi/Zhejiang.CHN/15.07/1	14	男	2007	含漱液	温州	-	+	+	+	+	1E	GQ374569
		ZJ07-2	RVi/Zhejiang.CHN/15.07/2	15	男	2007	含漱液	温州	-	+	+	-	-	1E	GQ374570
2008	10	ZJ08-1	RVi/Zhejiang.CHN/22.08	21	男	2008	咽拭子	杭州	-	+	+	+	+	1E	GQ374571
		ZJ08-2	RVi/Zhejiang.CHN/23.08	8	男	2008	咽拭子	丽水	-	+	+	+	-	2B	GQ374572
2010	2	ZJ10-1	RVi/Zhejiang.CHN/12.10	9	男	2010	口漱液	绍兴	-	+	+	+	+	1E	-

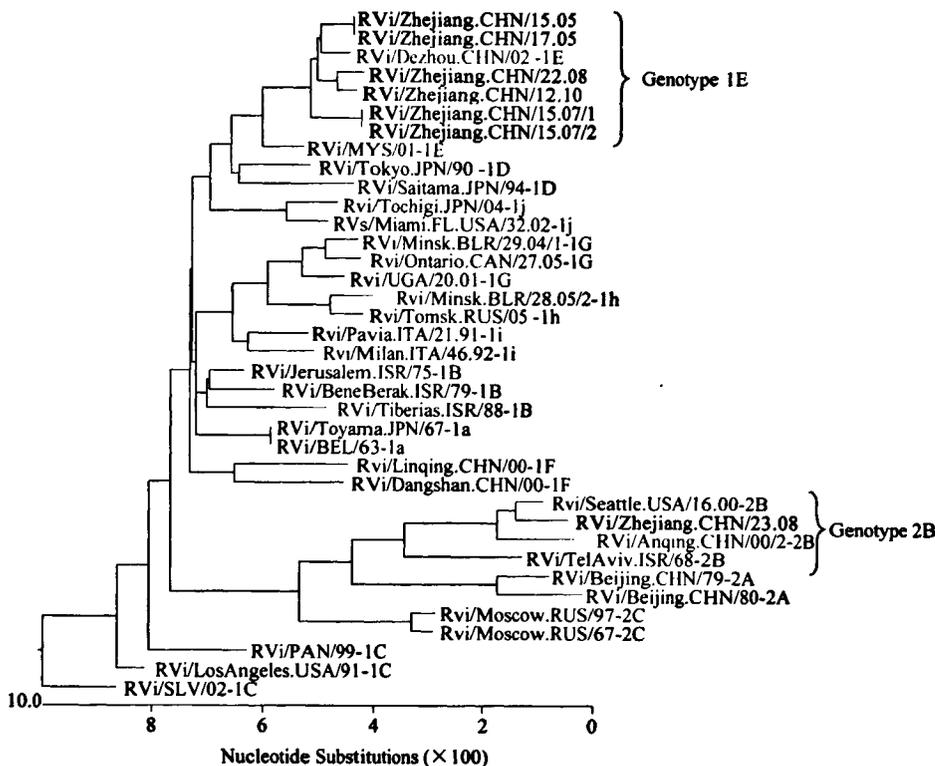


图 1 2005—2010 年浙江省风疹病毒流行株与 WHO 各基因型参考株 E1 基因 739nt 构建的基因系统进化树

RVi/Zhejiang.CHN/23.08 株与 2B 型内参考株、5 株中国 2B 型流行株以及全球其他地区 56 株 2B 型流行株构建进化树,并计算组内和组间遗传距离(表 2)。结果表明,中国 2B 型流行株组内遗传距离为 0.033,而全球其他地区 2B 流行株型内差异仅为 0.019,浙江 2B 型流行株与全球其他地区分离株组间遗传距离为 0.011,显著小于该毒株与 WHO 参考株以及中国流行株间的遗传距离,提示浙江省 2B 型流行株可能为境外输入株。从基因进化树上分析,浙江分离株与 BuenosAires.ARG/46.08 和 RVs/Maranhao.BRA/42.09 CRS 位于同一分支,E1 基因

Hainan.CHN/16.07/2 最为接近;2008 和 2010 年流行株分别与香港分离株 RVs/HongKong.CHN/29.10/3 和 RVi/HongKong.CHN/11.10 具有最近亲缘关系(图 2)。

739 nt 上的核苷酸水平上的同源性高达 99.86%(进化树未列出)。

3. 浙江 2B 基因型风疹流行株的亲缘关系:将

4. 浙江风疹流行株与疫苗株在结构基因上的同源性:在 E1 基因 739 nt 上,6 株 1E 基因型浙江流行

表 2 浙江省风疹流行株与疫苗株、WHO 推荐参考株以及各地流行株间的遗传距离分析

分组	1E 基因型					分组	2B 基因型				
	疫苗株 BRD II	1E 型 WHO 参考株	中国其他地区 1E 型流行株	全球其他地区 1E 型流行株	浙江 1E 型流行株		疫苗株 BRD II	2B 型 WHO 参考株	中国其他地区 2B 型流行株	全球其他地区 2B 型流行株	浙江 2B 型流行株
疫苗株 BRD II	n/c					疫苗株 BRD II	n/c				
WHO 1E 型参考株	0.097	<b>0.024</b>				WHO 2B 型参考株	0.074	<b>0.042</b>			
中国其他地区 1E 型流行株	0.100	0.019	<b>0.015</b>			中国其他地区 2B 型流行株	0.084	0.040	<b>0.033</b>		
全球其他地区 1E 型流行株	0.097	0.018	0.019	<b>0.012</b>		全球其他地区 2B 型流行株	0.082	0.039	0.029	<b>0.019</b>	
浙江 1E 型流行株	0.101	0.019	0.015	0.020	<b>0.015</b>	浙江 2B 型流行株	0.080	0.035	0.023	0.011	n/c

注:黑体数字为组内遗传距离,其余为组间遗传距离

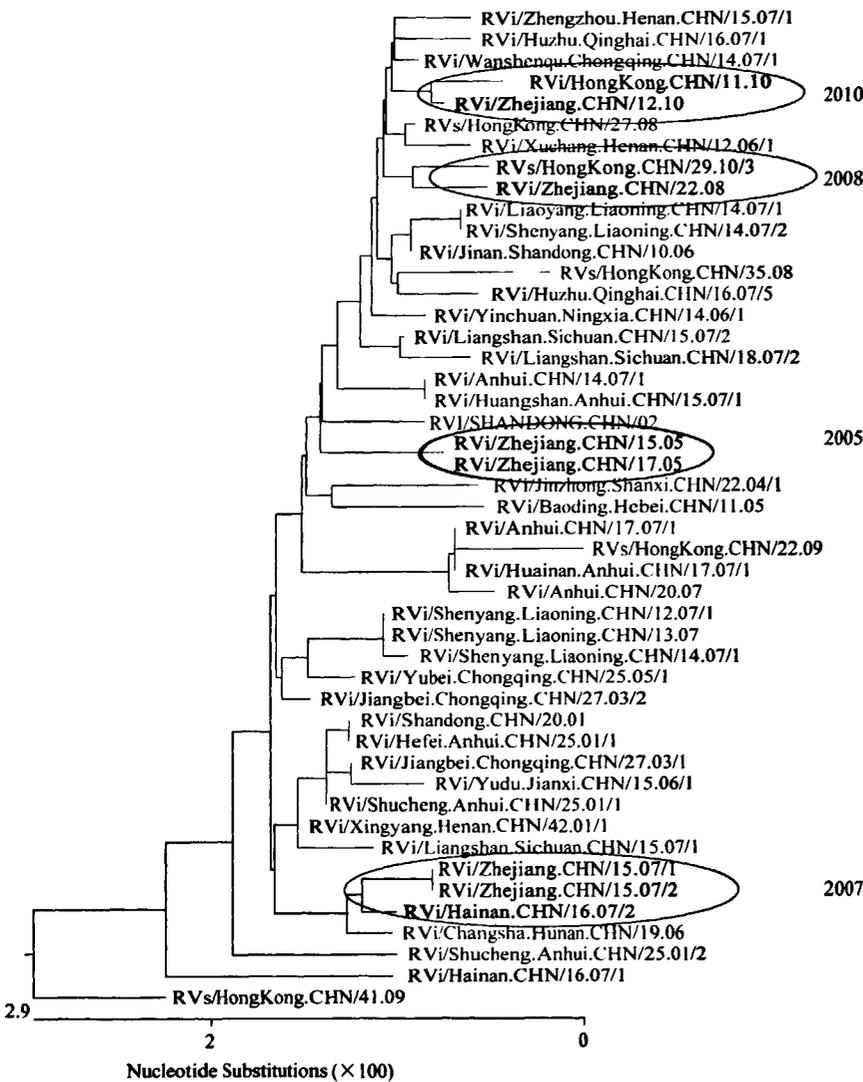


图2 2005—2010年浙江省风疹病毒流行株与GenBank中国其他省份流行株E1基因739 nt序列构建的基因进化树

株间存在6~15 nt的差异,推导的氨基酸差异仅为1个,提示流行株E1基因上核苷酸变异多为无义突变,氨基酸序列相对保守。

与中国疫苗株BRD II比较,浙江1E基因型流行株与其在E1、E2和C基因核苷酸水平上的同源性分别为89.72%、90.43%~90.66%和92.15%~92.51%,推导的氨基酸同源性分别为99.18%~99.59%、94.33%~95.39%和96.48%~96.83%,即核苷酸水平的变异为E1>E2>C,氨基酸水平上的变异为E2>

C>E1。

5. 浙江风疹病毒流行株结构  
 基因上氨基酸位点的变异:与疫苗株BRD II比较,浙江流行株E1、E2和C基因上分别存在3、23和11个氨基酸位点的突变(表3)。在E1蛋白上,除2005年流行株在第343位产生Asn<sup>343</sup>-Ger<sup>343</sup>突变外,所有1E基因型流行株在第338位氨基酸存在稳定的变异(Leu<sup>338</sup>-Phe<sup>338</sup>),而2B基因型流行株仅在第333位存在1个位点的变异。与疫苗株比较,1E基因型流行株在E2蛋白上存在12个共同变异位点,其中第111位氨基酸均由Ger变为Gla,但未造成第110位Asn的N型糖基化位点改变,流行株在E2基因上仍然保留4个N型糖基化位点。而2B型流行株在E2蛋白上共存在13个变异位点,其中第6、66、216和254位与1E基因型流行株变异相同。1E基因型流行株与疫苗株在C蛋白上共有11个位点的氨基酸变异,其中9个位点为稳定的变异位点。

为了进一步分析E1和E2蛋白上氨基酸序列的保守性和可变性,对流行株与疫苗株E1和E2基因上各个氨基酸位点进行熵值的计算。E1蛋白上第338位氨基酸熵值为0.636,其余2个位点熵值为0.450;E2蛋白上有8个氨基酸熵值大于0.600,即第8位氨基酸熵值为1.01,第17、173位熵值为0.868,第23、100、105、111和242位氨基酸熵值为0.636。

讨 论

WHO于2006年制定了风疹病毒基因分型标准,确定以E1基因编码的739个核苷酸(nt8731~

表3 浙江省风疹流行株与疫苗株在E1、E2和C基因上的氨基酸差异

病毒株	E1 基因																				E2 基因												C 基因											
	333	338	343	6	8	12	17	23	66	98	100	105	111	116	117	118	120	173	174	183	199	216	242	252	254	277	34	72	76	89	93	95	103	116	180	219	283							
BRD II	A	L	N	T	I	P	A	K	S	P	V	L	S	T	P	A	T	T	M	L	V	H	V	F	L	N	L	K	K	S	V	K	P	T	R	I	V							
ZJ05-1	F	S	A	M	P	Q	G	A	A	L	T	A	V	T	A	R	A	V	A	R	A	V	T	R	R	A	R	Q	S	P	V	A												
ZJ05-2	F	S	A	M	P	Q	G	A	A	L	T	A	V	T	A	R	A	V	A	R	A	V	T	R	R	A	R	Q	S	P	V	A												
ZJ07-1	F	A	M	P	Q	G	A	P	A	L	T	A	V	M	R	A	V	M	R	A	V	T	R	R	P	A	Q	S	P	V	A													
ZJ08-1	F	A	P	Q	G	A	A	L	T	A	V	A	R	A	V	T	R	R	A	V	T	R	R	A	Q	S	P	V	A															
ZJ08-2(2B) V	A	L	L	V	G	L	P	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A							
ZJ10-1	F	A	M	P	Q	G	A	A	L	T	A	V	A	R	A	V	T	R	R	A	V	T	R	R	A	Q	S	P	V	A														

9469, aa159 ~ 404) 作为靶序列进行基因型划分和分子流行病学研究<sup>[7]</sup>。我国曾有 4 种基因型(1E、1F、2A、2B) 风疹病毒流行, 但 2002 年后仅监测到 1E 和 2B 两种, 由于有 10 个省市分离到的流行株均为 1E 基因型, 因此 1E 被确认为我国优势基因型<sup>[8]</sup>, 本研究结果与之相符。虽然 2005—2010 年浙江省监测到两种基因型(1E 和 2B) 风疹病毒(图 1), 但 1E 型毒株多年持续流行, 提示该基因型可能为浙江省优势基因型。1E 基因型风疹病毒呈全球性分布, 无显著地域限制<sup>[9]</sup>, 从本研究遗传距离(表 2) 以及与其他地区流行株的亲缘关系(图 2) 来看, 我国近几年 1E 型风疹病毒呈交叉循环流行, 无明显的时间和地域性, 浙江省该基因型毒株分别与海南和香港等地区流行株最为接近, 为我国本土流行株, 且各年流行由不同的传播链引起。

已有的研究表明, 我国境内共分离到 6 株 2B 基因型风疹流行株, 包括安徽分离株 RVi/Anhui.CHN/00(2B 型内参考株)、2006 年四川分离株(越南输入) 2 株, 以及 2008—2009 年香港分离株 3 株<sup>[8]</sup>。浙江分离株与上述流行株的在核苷酸水平的差异为 4~28 nt, 而与境外分离株 BuenosAires.ARG/46.08 和 RVs/Maranhao.BRA/42.09 差异仅 1 nt(同源性 99.87%), 提示 2008 年浙江省 2B 型风疹流行株可能为境外输入株, 结合毒株分离时间, 本研究认为可能来源为 BuenosAires.ARG/46.08 或类似株的输入。根据流行病学调查资料, 浙江 2B 基因型分离株 RVi/Zhejiang.CHN/23.08 来源于丽水市一名 8 岁男性患儿, 系在一次学校风疹暴发疫情中感染, 患病前未去其他地区, 接触史不详。由于丽水市赴境外就业人员较多, 推测该患儿有与境外人员接触感染的可能。

与中国疫苗株 BRD II 比较, 流行株 E1 基因在核苷酸水平上的变异大于 E2 和 C 基因, 达 10.28%, 但多数核苷酸的变异为无义突变, 推导的氨基酸序列保守。在风疹病毒的三种结构蛋白中, 大多数与血凝以及中和相关的抗原决定簇位点存在于 E1 蛋白第 195~296 位氨基酸上, 而 3 个 N-联糖基化位点也分别位于第 76、177 和 209 位<sup>[10, 11]</sup>。浙江流行株 E1 蛋白上的氨基酸突变(第 333、338 和 343 位), 除第 338 位为中国 1E 型流行株的特征性突变位点外<sup>[8]</sup>, 其余均未涉及已知的抗原表位或糖基化位点, 流行株 E1 基因氨基酸序列的高度保守性可能对维持病毒抗原性的稳定具有重要作用。

目前, 对风疹病毒的研究主要集中在 E1 基因上, 但根据本研究结果, E2 和 C 蛋白的氨基酸变异

程度均大于 E1 蛋白。与疫苗株比较, 流行株 C 蛋白氨基酸变异率为 3.17%~3.52%, 但已知的 T 细胞表位(1 aa ~ 29 aa) 上未出现氨基酸突变<sup>[12]</sup>。流行株 E2 蛋白变异率达 5.67%, 且存在 7 个易突变位点和 1 个高突变位点。E2 蛋白为跨膜蛋白, 可与 E1 形成稳定的二聚体, 进而组装成病毒颗粒<sup>[13]</sup>, 该蛋白大多数为跨膜区, 且跨膜区上存在 4 个(第 53、71、110 和 129 位) N-联糖基化位点<sup>[14]</sup>。虽然, 目前流行株第 111 位的突变未造成 110 位 N-V 联糖基化位点的改变, 但其他跨膜区的变异是否涉及重要的功能区, E2 和 C 蛋白氨基酸高变异的原因究竟是什么, 是否会造成病毒二级结构的改变等问题尚不清楚。另外, 风疹疫苗使用多年, 长期免疫压力下病毒的变异状况也值得高度关注。因此, 在风疹病毒分子流行病学研究时, 除对 E1 基因监测外, 还应加强对 E2 和 C 蛋白的研究。

#### 参 考 文 献

- [1] WHO. Rubella vaccine. *Wkly Epidemiol Rec*, 2000, 75: 161-172.
- [2] Best JM, Enders G. Laboratory diagnosis of rubella and congenital rubella/Banatvala JE, Peckham C. Perspectives in medical virology—rubella viruses. London, Inc., 2007: 39-77.
- [3] WHO. Eliminating measles and rubella and preventing congenital rubella infection: WHO European Region Strategic Plan 2005-2010. Copenhagen, Denmark: WHO Regional Office for Europe, 2005.
- [4] CDC. Global measles and rubella laboratory network, January 2004-June 2005. *MMWR*, 2005, 54(43): 1100-1104.
- [5] Wu HS, Gao XP, Xu CP, et al. Development of the real-time reverse transcription-polymerase chain reaction assay for the rapid detection of rubella virus. *Chin J Vaccine Immunizat*, 2010, 16(1): 25-29. (in Chinese)  
吴华森, 高筱萍, 徐昌平, 等. 风疹病毒荧光反转录-聚合酶链反应快速检测方法的建立. *中国疫苗和免疫*, 2010, 16(1): 25-29.
- [6] Yan F, Santibanez S, Appleton H, et al. Application of new assays for rapid confirmation and genotyping of isolates of rubella virus. *J Med Virol*, 2011, 83: 170-177.
- [7] WHO. Standardization of the nomenclature for genetic characterization of wild-type rubella viruses. *Weekly Epidemiol Rec*, 2005, 80: 126-132.
- [8] Zhu Z, Xu WB, Mao NY, et al. Genetic characteristic of Chinese rubella virus isolates from 2003 to 2007. *Chin J Virol*, 2008, 24(1): 7-15. (in Chinese)  
朱贞, 许文波, 毛乃颖, 等. 2003—2007 年中国风疹病毒基因特征分析. *病毒学报*, 2008, 24(1): 7-15.
- [9] Zhu Z, Xu WB. Molecular epidemiological of rubella virus. *Chin J Vaccine Immunizat*, 2007, 13(4): 399-406. (in Chinese)  
朱贞, 许文波. 风疹病毒的分子流行病学. *中国计划免疫*, 2007, 13(4): 399-406.
- [10] Terry GM, Ho Terry L, Londesborough P, et al. Localization of the rubella E1 epitopes. *Arch Virol*, 1988, 98: 189-197.
- [11] Hobman TC, Qiu ZY, Chaye H, et al. Analysis of rubella virus E1 glycosylation mutants expressed in COS cells. *Virology*, 1991, 181(2): 768-772.
- [12] Lovett AE, Hahn CS, Rice CM, et al. Rubella virus-specific cytotoxic T-lymphocyte responses: identification of the capsid as a target of the major histocompatibility complex class I-restricted lysis and definition of two epitopes. *J Virol*, 1993, 67(10): 5849-5858.
- [13] Frey TK. Molecular biology of rubella virus. *Adv Virus Res*, 1994, 44: 69-160.
- [14] Lundstorm ML, Mauracher CA, Tingle AJ. Characterization of carbohydrates linked to rubella virus glycoprotein E2. *J Gen Virol*, 1991, 72: 843-850.

(收稿日期: 2011-04-01)

(本文编辑: 张林东)