

肺炎链球菌PCR分型技术的建立与应用

李马超 张砾 李倩 任红宇 王晓蕾 徐丽 邵祝军

【摘要】 目的 建立肺炎链球菌血清型分型的PCR简便方法,初步了解肺炎链球菌血清型/群的分布状况。方法 设计合成12种肺炎链球菌血清型/群特异性引物,优化不同血清型/群引物PCR条件,并检测最佳反应浓度、灵敏性以及特异性;初步应用于肺炎链球菌菌株的血清型/群检测。结果 引物浓度优化后,12种肺炎链球菌血清型/群特异引物呈现较好的特异性与敏感性;对119株肺炎链球菌菌株进行PCR分型检测,其中113株可分为9个血清型/群(3、5、6A/B、9A/V、14、18、19A、19F、23F),6株未分群。结论 初步建立了12种血清型/群肺炎链球菌PCR分型技术,可用于鉴别人群中主要流行的肺炎链球菌血清型/群。

【关键词】 肺炎链球菌;血清型;聚合酶链反应

Establishment and application of PCR method in serotyping of *Streptococcus pneumoniae* Li Ma-chao¹, ZHANG Li², LI Qian³, REN Hong-yu¹, WANG Xiao-lei², XU Li³, SHAO Zhu-jun¹. 1 State Key Laboratory for Infectious Disease Prevention and Control, National Institute for Communicable Disease Control and Prevention, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing 102206, China; 2 Chengdu Children's Hospital; 3 School of Public Health, Sichuan University
Corresponding author: SHAO Zhu-jun, Email: shaozhujun@icdc.cn

【Abstract】 Objective To establish a method based on PCR for serotyping of *Streptococcus pneumoniae* isolates. PCR serotyping method was applied for investigating the serotypes of *S. pneumoniae* strains. Methods 12 pairs of primers targeting different serotypes of *S. pneumoniae* were designed and synthesized. After optimizing the PCR amplification reaction, sensitivity and specificity of each pair was performed. We applied the PCR methods for testing the serotypes of the isolated *S. pneumoniae* strains. Results Each pair of primers showed satisfied PCR sensitivity and specificity. Of all 119 *S. pneumoniae* strains tested by PCR serotyping method, 113 isolates were identified (3, 5, 6A/B, 9A/V, 14, 18, 19A, 19F, 23F) with 6 isolates were unable to be serotyped. Conclusion We developed a simple, reliable and economic method for *S. pneumoniae* serotyping which could be used for testing the serotypes of *S. pneumoniae* that had been prevailed among general population.

【Key words】 *Streptococcus pneumoniae*; Serotype; Polymerase chain reaction

肺炎链球菌(*Streptococcus pneumoniae*)血清型/群的流行病学特征对于评价肺炎链球菌的疾病负担、疫苗血清型/群覆盖率、疫苗免疫学效果评价以及了解该菌血清型/群与耐药特征之间的关系尤为重要^{1、2}。荚膜肿胀实验(quellung reaction)是传统的肺炎链球菌血清学分型/群方法,但该方法费用较高且操作复杂,对操作人员的技术要求较高,在日常的检测中常不能得到广泛应用。PCR方法由于其灵敏度高、操作简便、成本相对较低等优点已经成为肺炎链球菌分型/群的重要手段。本研究拟建立一种基于

PCR技术的快速、简便、成本低廉的肺炎链球菌血清分型方法,初步应用成都地区儿童中分离肺炎链球菌的分型检测。

材料与方法

1. 菌株来源:本研究共采用菌株145株。其中肺炎链球菌参考菌株16株[12株由美国疾病预防控制中心惠赠,2株购自中国生物制品检定所,1株购自美国ATCC,1株购自丹麦国立血清研究所(SSI),所有参考菌株均已经过血清学验证],菌株编号(血清群/型)分别为NCTC7465(1)、31001(1)、164-07(3)、31003-17(3)、BAA-334(4)、112-07(5)、182-07(6A)、113-07(6B)、218-07(7F)、207-07(9V)、111-07(14)、235-07(18C)、155-07(19A)、146-07(19F)、ATCC49619(19F)、SSI20060525-14

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2010.03.019

作者单位:102206 北京,中国疾病预防控制中心传染病预防控制所
传染病预防控制国家重点实验室(李马超、任红宇、徐丽、邵祝军);
成都市儿童医院(张砾、王晓蕾);四川大学华西公共卫生学院(李倩)

通信作者:邵祝军, Email: shaozhujun@icdc.cn

(23F);119株肺炎链球菌分离菌株(其中9株为全国脑膜炎监测网的患者分离株,110株为成都市儿童医院临床分离株);其他菌株分别为金黄色葡萄球菌 ATCC25923、轻型链球菌 NCTC12261、大肠埃希菌 ATCC25922、粪肠球菌 ATCC29212、绿脓假单胞菌 ATCC27853、A群链球菌分离株2株、B群链球菌分离株1株、副流感嗜血杆菌分离株1株、肺炎克雷伯菌分离株1株。上述肺炎链球菌菌株均经奥普托欣敏感性实验及胆汁溶解实验验证。

2. 试剂与设备: TaqDNA聚合酶、dNTPs、100 bp DNA Marker均购自大连宝生物 TaKaRa公司,超纯水购自美国 Gibical公司,PCR引物由北京赛百盛公司合成,DNA提取试剂盒购自德国 QIAGEN公司,肺炎链球菌分型血清 PNEUMOTEST 购自丹麦 SSI; PCR扩增仪为美国 BIO-RAD PT-200,凝胶成像系统为美国 Bio-Rad Geldoc XR,分光光度计为德国 Eppendorf Biophotometer。

3. 实验方法:

(1)引物设计:本实验中采用两组引物对肺炎链球菌菌株进行分型分析^[3-6];肺炎链球菌种属特异性扩增引物 *cpsA*,血清型/群特异性扩增引物分别为1、

3、4、5、6A/B、7F、9V、14、18C、19A、19F、23F(表1)。

(2)DNA提取:收集血平板上培养18~24 h的肺炎链球菌菌落,采用 QIAGEN 细菌基因组提取试剂盒提取DNA(提取方法参照试剂盒说明书),测定DNA浓度。

(3)PCR扩增:反应体系为20 μl,其中2 μl 10× PCR buffer、0.2 mmol/L dNTP、TaqDNA聚合酶1 U、DNA 5 μl。反应条件94℃ 4 min;94℃ 45 s,54℃ 45 s,72℃ 90 s,30个循环;72℃ 5 min。

(4)凝胶图像分析:扩增产物经1.0%的琼脂糖凝胶电泳,5 V/cm 1 h,收集图像。

(5)引物浓度优化及灵敏性检测:以菌株 BAA-334DNA 为模板,5倍梯度稀释成10个浓度,加入 *cpsA* 引物浓度分别为0.2、0.5、1.0 μmol/L的反应体系中,检测引物的最佳浓度及灵敏性;同上操作,分别以31001、164-07、BAA-344、112-07、182-07、218-07、207-07、111-07、235-07、155-07、146-07、SSI20060525-14 DNA为模板对1、3、4、5、6A/B、7F、9V、14、18C、19A、19F、23F引物进行引物浓度优化及灵敏性检测。

(6)引物特异性检测:以 *cpsA* 引物分别扩增肺

表1 肺炎链球菌血清型/群分型引物序列

引物	引物序列(5'~3')	基因编号	扩增片段长度(bp)	对应血清型/群
<i>cpsA</i> -f	GGT GTT CTC TAT CCT TGT CAG CTC TGT GTC GCT C	AF057294	657	S _p
<i>cpsA</i> -r	GTG TGA ATG GTC GAA TCA ACT CTA TAA ATG CC			
1-f	CTC TAT AGA ATG GAG TAT ATA AAC TAT GGT TA	Z83335	280	1
1-r	CCA AAG AAA ATA CTA ACA TTA TCA CAA TAT TGG C			
3-f	ATG GTG TGA TTT CTC CTA GAT TGG AAA GTA G	Z47210	371	3
3-r	CTT CTC CAA TTG CTT ACC AAG TGC AAT AAC G			
4-f	CTG TTA CTT GTT CTG GAC TCT CGA TAA TTG G	AF316639	430	4
4-r	GCC CAC TCC TGT TAA AAT CCT ACC CGC ATT G			
5-f	ATA CCT ACA CAA CTT CTG ATT ATG CCT TTG TG	AY336008	362	5
5-r	GCT CGA TAA ACA TAA TCA ATA TTT GAA AAA GTA TG			
6A/B-f	AAT TTG TAT TTT ATT CAT GCC TAT ATC TGG	AF316640	250	6A,6B
6A/B-r	TTA GCG GAG ATA ATT TAA AAT GAT GAC TA			
7F-f	CCT ACG GGA GGA TAT AAA ATT ATT TTT GAG	554/62	826	7A,7F
7F-r	CAA ATA CAC CAC TAT AGG CTG TTG AGA CTA AC			
9V-f	CTT CGT TAG TTA AAA TTC TAA ATT TTT CTA AG	980/68	753	9A,9V
9V-r	GTC CCA ATA CCA GTC CTT GCA ACA CAA G			
14-f	CTT GGC GCA GGT GTC AGA ATT CCC TCT AC	34359	208	14
14-r	GCC AAA ATA CTG ACA AAG CTA GAA TAT AGC C			
18C-f	GCA TCT GTA CAG TGT GCT AAT TGG ATT GAA G	AF316642	354	18A,18B,18C,18F
18C-r	CTT TAA CAT CTG ACT TTT TCT GTT CCC AAC			
19A-f	GTT AGT CCT GTT TTA GAT TTA TTT GGT GAT GT	AF094575	478	19A
19A-r	GAG CAG TCA ATA AGA TGA GAC GAT AGT TAG			
19F-f	GTT AAG ATT GCT GAT CGA TTA ATT GAT ATC C	U09239	304	19F
19F-r	GTA ATA TGT CTT TAG GGC GTT TAT GGC GAT AG			
23F-f	TGG TAG TGA CAG CAA CGA	AF030373	177	23F
23F-r	CAA AGG CTA ATT CAG CAT C			

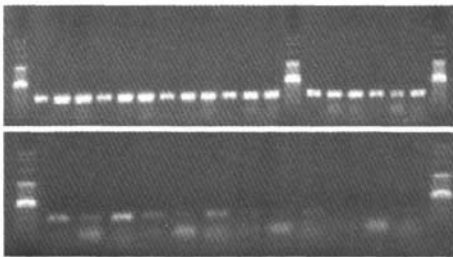
炎链球菌参考菌株16株和10株其他菌株;分别以31001、164-07、BAA-344、112-07、182-07、218-07、207-07、111-07、235-07、155-07、146-07、SSI20060525-14 DNA为模板,对1、3、4、5、6A/B、7F、9V、14、18C、19A、19F、23F引物进行交叉扩增检测引物特异性。

(7)肺炎链球菌分离菌株血清分型:采用荚膜肿胀试验,油镜下如荚膜显著肿大,菌体周围有一无色而较宽的环状物时,判断为荚膜肿胀试验阳性。

(8)肺炎链球菌分离菌株PCR检测:以cpsA引物对119株临床肺炎病例肺炎链球菌分离菌株进行检测;cpsA引物扩增阳性菌株,继续以1、3、4、5、6A/B、7F、9V、14、18C、19A、19F、23F引物进行扩增,确定血清型/群。

结 果

1. 引物的最佳反应浓度及灵敏性:将出现最多明亮扩增条带时反应体系的引物浓度定为最佳反应浓度;若多个反应体系同时出现相同扩增结果,以最低引物浓度的反应体系为参考。将出现最多扩增条带时,亮度最低且肉眼可辨扩增条带所对应的反应体系中的DNA浓度,定为反应的灵敏性(以19F引物为例,见图1)。12对血清型/群特异性引物的最佳反应浓度及灵敏性结果见表2。



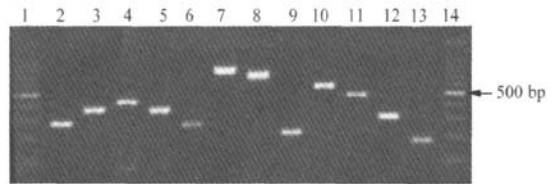
注:从左至右每三条泳道为同一个DNA稀释浓度,5倍梯度稀释共10个DNA稀释浓度;每条泳道的引物浓度(μmol/L)分别为0.2、0.5和1.0

图1 19F cps I引物最佳反应浓度及灵敏性检测

表2 不同引物的最佳反应浓度及灵敏性

引物	最佳反应浓度(μmol/L)	灵敏性(pg/μl)	引物	最佳反应浓度(μmol/L)	灵敏性(pg/μl)
cpsA	0.2	1	9V	0.5	1
1	0.2	1	14	0.2	1
3	0.2	1	18C	0.5	1
4	0.5	10	19A	0.2	1
5	1.0	1	19F	0.2	1
6A/B	0.5	1	23F	0.2	10
7F	0.2	1			

2. 引物特异性:以cpsA引物对肺炎链球菌参考菌株16株和10株其他菌株的核酸提取物,在最佳反应浓度下进行PCR扩增,肺炎链球菌株均能得到阳性扩增产物;其他非肺炎链球菌菌株DNA未产生阳性扩增结果。分别以1、3、4、5、6A/B、7F、9V、14、18C、19A、19F、23F引物在最佳反应浓度下对31001、164-07、BAA-344、112-07、182-07、218-07、207-07、111-07、235-07、155-07、146-07、SSI20060525-14 DNA进行扩增,均呈现引物特异性扩增结果(图2);且未出现交叉扩增阳性扩增结果(表3)。



注:1~14:100 bp Marker、1、3、4、5、6A/B、7F、9V、14、18C、19A、19F、23F和100 bp Marker

图2 12种分型/群引物特异性扩增结果

3. 肺炎链球菌分离菌株血清分型:全部119株肺炎链球菌分离菌株中,1株(0.84%)血清群为3;1株(0.84%)血清群为5;32株(26.89%)血清群为6;2株(1.68%)血清群为9;11株(9.24%)血清群为14;2株(1.68%)血清群为18;53株(44.54%)血清群为19;11株(9.24%)血清群为23;6株未分群。

4. 肺炎链球菌分离菌株PCR检测:以cpsA引物扩增119株肺炎链球菌分离菌株均呈阳性扩增结果。以分型引物分别对分离菌株DNA进行扩增,113株(94.96%)呈阳性反应,6株未分群。可分型菌株中,1株(0.84%)血清群为3;1株(0.84%)血清群为5;32株(26.89%)血清型为6A/B;2株(1.68%)血清型为9A/V;11株(9.24%)血清群为14;2株(1.68%)血清群为18;53株(44.54%)血清群为19,其中10株为血清型19A,43株为血清型19F;11株(9.24%)血清型为23F;PCR检测结果与血清学分型结果完全吻合。

讨 论

肺炎链球菌是严重危害老年人和儿童身体健康的重要病原体之一。目前已知肺炎链球菌的90个血清型/群中虽然只有少部分血清型/群能够导致人群发病^[7,8],但该菌所导致的疾病在世界范围内仍成为一个严重的公共卫生问题。而针对这部分血清

表 3 分型引物特异性扩增

血清型引物	31001 (1)	164-07 (3)	BAA-344 (4)	112-07 (5)	182-07 (6A)	218-07 (7F)	207-07 (9V)	111-07 (14)	235-07 (18C)	155-07 (19A)	146-07 (19F)	SSI20060525-14 (23F)
1	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
6A/B	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
7F	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
9V	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
14	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
18C	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
19A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
19F	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
23F	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+

注: + 扩增阳性, - 扩增阴性

型/群所设计的疫苗,已经被证明可以作为一种有效的手段抵抗肺炎链球菌所带来的危害^[9]。

目前在全球范围内,已经商品化肺炎链球菌疫苗主要分为多糖疫苗和结合疫苗两种。多个国家疫苗应用数据显示,疫苗在人群中的广泛接种均可以使肺炎链球菌相关疾病的发病率明显减低,并呈现较高的保护力^[10,11]。本研究所采用的引物能够鉴别肺炎链球菌 1、3、4、5、6A/B、7A/F、9A/V、14、18A/B/C/F、19A、19F、23F 等血清型/群,分别覆盖了 23 价疫苗、11 价疫苗、7 价疫苗所包含血清型/群的 52.17%、100% 和 100%。虽然在已上市的 7 价和 11 价疫苗中均未包括血清型 19A,但有报道证明大量接种 7 价或 11 价疫苗后,儿童及成年携带者中分离到的 19A 型菌株呈上升趋势^[12]。因此,本研究选择 19A 引物用以鉴别 19A 型菌株。疫苗的长期使用可能会导致肺炎链球菌血清流行病学方面的变化,已有人群携带的肺炎链球菌血清型/群由疫苗覆盖血清型/群向非疫苗覆盖血清型/群的转变的相关报道^[13,14]。

近年来,非疫苗覆盖血清型/群肺炎链球菌的感染病例逐渐增多,而其耐药菌株的不断扩散逐渐为专业工作者所重视^[15,16],针对该菌的监测已经成为肺炎链球菌相关疾病预防控制工作的重要组成部分。目前,以了解血清学分布为主要目的常规监测主要是通过收集菌株的培养、血清学鉴定来完成;但所用血清比较昂贵,对结果解释的操作人员主观依赖性较强、且专业技能要求较高,这已经成为制约血清学分型技术推广的主要缺陷。随着分子生物学技术的快速发展以及 PCR 手段的推广,建立在 PCR 技术基础上的分子分型技术可以成功的克服传统血清分型技术的缺点;另外,以 PCR 技术为基础的分型方法还可以用于一些临床上不能直接用血清鉴定标本的分型以及一些对传统血清学分型方法不敏感

标本的检测^[17]。

荚膜是肺炎链球菌的最主要致病因子,而荚膜的产生主要是由荚膜合成基因簇(*cps*)调控的,*cps* 存在于几乎所有肺炎链球菌基因组中,且相对保守。本研究用于鉴定肺炎链球菌的 *cpsA* 引物,以及用于分型的引物对所对应的基因序列大多来自 *cps*,且均经过 Southen 印迹实验的检验^[18]。

肺炎链球菌 PCR 分子分型技术也存在一定的缺陷。对于 *cpsA* 引物,虽然其扩增的基因序列高度保守,但已有文献报道对于极少数菌株不能扩增出阳性产物^[19],推测其原因可能是 *cpsA* 基因的缺失或突变导致;虽然在本研究中未发现类似情况,但这并不表示 *cpsA* 引物扩增阴性的菌株就一定是非肺炎链球菌。本研究所采用的分型引物设计也存在一定的不足。首先,以 PCR 技术为基础的分子分型方法所能鉴定的肺炎链球菌血清型/群有限。例如本研究中有 6 株肺炎链球菌未能分型,分析原因可为:所采用的肺炎链球菌分型引物不能覆盖目前全部的血清型/群,另外也不能排除新的血清型存在的可能。其次,一些分型引物为血清群特异性而非血清型特异性,例如 6A/B 引物阳性扩增结果的菌株可能是血清型 6A 也可能是血清型 6B。这些应在后续试验中完善。

此外,本研究 110 株分离于成都市儿童医院菌株,主要以血清型 6A/B、14、19A、19F、23F 为主;9 株分离于全国脑膜炎监测网患者的菌株,主要以血清群 6、19 为主。这为制定肺炎链球菌疾病的防治策略提供了基础性资料。

虽然以 PCR 为基础的分子分型技术还存在一定的局限性,但相对于传统的血清学分型技术,仍不失为一种简便快捷、费用较低且准确可靠的手段,可广泛应用于常规监测,成为可依赖的分型手段。

参 考 文 献

- [1] Scott JA, Hall AJ, Dagan R, et al. Serogroup-specific epidemiology of *Streptococcus pneumoniae*: associations with age, sex, and geography in 7000 episodes of invasive disease. *J Clin Infect Dis*, 1996, 22(6):973-981.
- [2] Alonso De Velasco, Verheul AF, Verhoef J, et al. *Streptococcus pneumoniae*: virulence factors, pathogenesis, and vaccines. *J Microbiol Rev*, 1995, 59(4):591-603.
- [3] Morona JK, Morona R, Paton JC, et al. Analysis of the 5 portion of the type 19A capsule locus identifies two classes of *cpsC*, *cpsD*, and *cpsE* genes in *Streptococcus pneumoniae*. *J Bacteriol*, 1999, 181(11):3599-3605.
- [4] Pai R, Gertz RE, Beall B. Sequential multiplex PCR approach for determining capsular serotypes of *Streptococcus pneumoniae* isolates. *J Clin Microbiol*, 2006, 44(1):124-131.
- [5] Jiang SM, Wang L, Reeves PR. Molecular characterization of *Streptococcus pneumoniae* type 4, 6B, 8, and 18C capsular polysaccharide gene clusters. *Infect Immun*, 2001, 69(3):1244-1255.
- [6] Lawrence ER, Griffiths DB, Martin SA, et al. Evaluation of semiautomated multiplex PCR assay for determination of *Streptococcus pneumoniae* serotypes and serogroups. *J Clin Microbiol*, 2003, 41(2):601-607.
- [7] Hausdorff WP, Bryant J, Paradiso PR, et al. Which pneumococcal serogroups cause the most invasive disease: implications for conjugate vaccine formulation and use, part I. *J Clin Infect Dis*, 2000, 30(1):100-121.
- [8] Robinson KA, Baughman W, Rothrock G, et al. Epidemiology of invasive *Streptococcus pneumoniae* infections in the United States 1995-1998. *JAMA*, 2001, 285(13):1729-1735.
- [9] Whitney CG, Farley MM, Hadler J, et al. Decline in invasive pneumococcal disease after the introduction of protein-polysaccharide conjugate vaccine. *J Med*, 2003, 348(18):1737-1746.
- [10] Butler JC, Breiman RF, Campbell JF, et al. Pneumococcal polysaccharide vaccine efficacy. An evaluation of current recommendations. *JAMA*, 1993, 270(15):1826-1831.
- [11] Kaplan SL, Mason EO, Wald ER, et al. Decrease of invasive pneumococcal infections in children among 8 children's hospitals in the United States after the introduction of the 7-valent pneumococcal conjugate vaccine. *Pediatrics*, 2004, 113(3):443-449.
- [12] Pai R, Moore MR, Pilishvili T, et al. Post vaccine genetic structure of *Streptococcus pneumoniae* serotype 19A from children in the United States. *J Infect Dis*, 2005, 192(11):1988-1995.
- [13] Ghaffar F, Barton T, Lozano J, et al. Effect of the 7-valent pneumococcal conjugate vaccine on nasopharyngeal colonization by *Streptococcus pneumoniae* in the first 2 years of life. *J Clin Infect Dis*, 2004, 39(7):930-938.
- [14] Hoffman JA, Mason EO, Schutze GE, et al. *Streptococcus pneumoniae* infections in the neonate. *Pediatrics*, 2003, 112(5):1095-1102.
- [15] Pelton SI. Acute otitis media in the era of effective pneumococcal conjugate vaccine: will new pathogens emerge? *Vaccine*, 2000, 19(1):S96-99.
- [16] Lipsitch M. Interpreting results from trials of pneumococcal conjugate vaccines: a statistical test for detecting vaccine-induced increases in carriage of nonvaccine serotypes. *J Epidemiol*, 2001, 154(1):85-92.
- [17] Lawrence ER, Arias CA, Duke B, et al. Evaluation of serotype prediction by *cpsA-cpsB* gene polymorphism in *Streptococcus pneumoniae*. *J Clin Microbiol*, 2000, 38(4):1319-1323.
- [18] O'Halloran DM, Cafferkey MT. Multiplex PCR for identification of seven *Streptococcus pneumoniae* serotypes targeted by a 7-valent conjugate vaccine. *J Clin Microbiol*, 2005, 43(7):3487-3490.
- [19] Brito DA, Ramirez M, Lencastre De H, et al. Serotyping *Streptococcus pneumoniae* by multiplex PCR. *J Clin Microbiol*, 2003, 41(6):2378-2384.

(收稿日期:2009-08-31)

(本文编辑:张林东)

· 有错即改 ·

本刊2009年第30卷第11期“安徽省既往献血员HIV感染后生存时间和抗病毒治疗效果研究”一文数据更正

尊敬的编委您好!

我是安徽医科大学的一位在读研究生,也是中华流行病杂志的忠实读者,今天上午在读到贵刊时,发现有一问题,可能是印刷或者其他的问题(编者注:实质是编辑和校对中出现的问题),现向你们反映一下。在贵刊2009年11月第30卷第11期的1135页(文章题目:安徽省既往献血员HIV感染后生存时间和抗病毒治疗效果研究)的中文摘要中,有这样一句:“实际死亡761例”,我个人认为应该改成:“实际死亡76例”,请核对!最后祝贵刊越办越好!

闫成锐

2010年3月3日

编者的回复:

本刊感谢闫成锐同学认真阅读的精神,在目前这种社会盲目追求功利的背景下尤显可贵。本刊一定不负忠实读者的众望,努力做好杂志出版的每一项工作,并对该文作者深表歉意。

本刊编辑部

2010年3月4日