

· 实验室研究 ·

水痘-带状疱疹病毒临床分离株 基因特征分析

甘霖 王明丽 赵俊 陈敬贤

【摘要】 目的 运用分子生物学方法对水痘或带状疱疹患者皮肤水疱液及水痘疫苗中分离得到的水痘-带状疱疹病毒(VZV)株进行基因特征分析。方法 从水痘疫苗、水痘或带状疱疹患者的皮肤水疱液中分离 VZV, 然后利用聚合酶链反应和限制性片段长度多态性对病毒株的 ORFs 6、38、62 进行分析, 同时测序分析 ORFs 1、31、51 和 62 中的单个核苷酸多态性位点。结果 4 种疫苗酶切结果均为 *Alu I*⁻ *Pst I*⁻ *Sma I*⁺ *BssH II*⁺ *Nae I*⁺, 49 株 VZV 临床分离株中 *Alu I*⁺ *Pst I*⁺ *Sma I*⁻ *BssH II*⁻ *Nae I*⁻ 占 96% (47 株), *Alu I*⁻ *Pst I*⁻ *Sma I*⁺ *BssH II*⁺ 占 2% (1 株), *Alu I*⁺ *Pst I*⁻ *Sma I*⁻ *BssH II*⁻ *Nae I*⁻ 占 2% (1 株), 其中 1 例患者的临床分离病毒株与疫苗一致; 测序分析显示不同疫苗核苷酸序列之间存在差异, 分离得到的疫苗株病毒序列与 Varilrix 一致。结论 存在疫苗引起水痘的情况, 测定 ORFs 6、62 中的限制性片段长度多态性能够区分疫苗株和野毒株, 对 ORFs 1、31、51 和 62 中的单个核苷酸多态性位点进行分析可追踪疫苗致病的病毒株来源。

【关键词】 水痘-带状疱疹病毒; 水痘疫苗; 临床分离株

Genetic analysis of clinical varicella-zoster virus isolates collected in China GAN Lin¹, WANG Ming-li¹, ZHAO Jun¹, CHEN Jing-xian^{1,2}. 1 Department of Microbiology, Anhui Medical University, Hefei 230032, China; 2 Department of Pathology & Cell Biology, Columbia University, New York, United States

Corresponding author: CHEN Jing-xian, Email: jc28@columbia.edu

This work was supported by a grant from the Natural Science Foundation of China (No. 30872253)

【Abstract】 **Objective** To study the genetic characteristics of vaccine and varicella-zoster virus (VZV) strains isolated from patients with chickenpox or zoster by molecular analysis. **Methods** SNP based VZV genetic characteristics were analyzed in 19 VZV isolates using the restriction fragment length polymorphisms analysis of DNA fragments of the open reading frames 6, 38, 62 and sequence alignment of the open reading frames 1, 31, 51, 62. **Results** All vaccine strains were revealed *Alu I*⁻ *Pst I*⁻ *Sma I*⁺ *BssH II*⁺ *Nae I*⁺, 96% clinical isolates were revealed *Alu I*⁺ *Pst I*⁺ *Sma I*⁻ *BssH II*⁻ *Nae I*⁻, 2% clinical isolates were revealed *Alu I*⁻ *Pst I*⁻ *Sma I*⁺ *BssH II*⁺, 2% clinical isolates were revealed *Alu I*⁺ *Pst I*⁻ *Sma I*⁻ *BssH II*⁻ *Nae I*⁻ by restriction fragment length polymorphisms analysis and sequence alignment revealed the mutations also presented in this four vaccine strains. **Conclusion** Use the restriction fragment length polymorphisms analysis of DNA fragments of the open reading, frames 6 and 62 could be distinguished VZV wild-type strains and vaccine strain in clinical isolates in China. In order to find the adverse effect caused by vaccine from certain company's, analysis on the SNPs in ORFs 1, 31, 51 and 62 is needed.

【Key words】 Varicella-zoster virus; Varicella vaccine; Clinical isolates

水痘-带状疱疹病毒(VZV)属疱疹病毒α亚科, 为双链DNA病毒, 其原发感染引起水痘, 潜伏感染再激活时可引发带状疱疹。对于具有正常免疫力的儿童, 水痘是一种良性、自限性过程, 但是对于免疫

功能低下者而言, 水痘则是一种严重的甚至是致命性的疾病^[1,2]。自从1995年美国FDA批准Oka水痘减毒活疫苗用于预防水痘以来, 世界上多个国家相继开始使用该疫苗。我国从1998年开始引进该疫苗用于12个月以上的VZV易感个体预防水痘。目前所使用的病毒株均为日本Biken研究院的Oka减毒株。近年来, 研究发现接种水痘疫苗后病毒可潜伏在疫苗接种者的感觉神经节中, 并能被再激活而引发带状疱疹^[3,4], 患者与易感个体接触后还可引起

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2010.02.017

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(甘霖、王明丽、赵俊、陈敬贤); 美国哥伦比亚大学病理和细胞生物学系(陈敬贤)

通信作者: 陈敬贤, Email: jc28@columbia.edu

水痘^[5,6]。因此在广泛使用减毒活疫苗的同时,有必要追踪水痘和带状疱疹病例中是否存在由疫苗株致病的可能。为此我们对 4 种水痘疫苗和合肥地区分离的 49 株 VZV 进行聚合酶链反应和限制性片段长度多态性(PCR-RFLP)分析,并对各病毒株的开放读码框(ORF)1、31、51 和早期基因 ORF62 中的部分单核苷酸多态性位点(SNP)进行分析比对,以期找出疫苗之间以及疫苗与临床分离株之间的基因特征差异。

材料与方 法

1. 细胞、病毒和抗体:人胚成纤维细胞(HF)为本室制备并保存;标本采自安徽医科大学第一附属医院皮肤科门诊的水痘或带状疱疹疑似患者的皮肤水疱液;对每例患者询问并记录有无 VZV 疫苗接种史;针对 VZV 糖蛋白 gE 和主要转录激活因子 ORF62 的特异性多克隆抗体、日本 Oka 疫苗亲本株(p-Oka)、默克公司的 Varivax[®]和 VZV 美国野毒株(MLS)由美国哥伦比亚大学 Gershon 教授惠赠;VZV 减毒活疫苗分别购自上海生物制品研究所(批号:2007120401)、长春百克生物科技有限公司(批号:200807101)和葛兰素史克公司的 Varilrix[®](批号:XVARB191A1)。

2. 病毒分离与鉴定:参照参考文献[7]进行。取 10 μl 患者皮肤水疱液或相当于 500 pfu 的疫苗,接种单层 HF 细胞后置 5%CO₂ 孵箱 37 °C 培养,待出现特征性细胞病变效应(CPE)后,取少量细胞涂片,应用 VZV 糖蛋白 gE 和病毒早期蛋白 IE62 的多克隆抗体,通过间接免疫荧光染色予以鉴定。

3. 病毒 DNA 的提取:将分离的病毒株转种在已经长满 HF 细胞、直径为 60 mm 的培养皿中,待细胞病变达 80% 以上时,用 TaKaRa MiniBEST Viral RNA/DNA Extraction Kit Ver.3.0 试剂盒(大连宝生物工程有限公司)提取总 DNA。用同样的方法提取 p-Oka、MLS 病毒株和正常 HF 细胞的 DNA;V-Oka DNA 从未经分离培养的减毒活疫苗中直接提取。所有提取 DNA 经紫外分光光度法确定浓度以后,置 -20 °C 保存。

4. PCR-RFLP:采用 VZV 各相关基因的特异性引物(表 1),通过 PCR 扩增 ORFs 6、38、62 的 DNA 片段以正常 HF 细胞的 DNA 作为阴性对照。ORFs 6、

38、62 的 PCR 产物分别用 *AluI*、*PstI*、*SmaI* (Fermentas 公司产品)进行单酶切和 *BssHII*、*NaeI* 双酶切。*AluI*、*PstI* 以及 *BssHII*、*NaeI* 双酶切的产物分别经 2% 的琼脂糖凝胶 80 V 电泳 100 min 后观察结果,*SmaI* 的酶切产物经 4% 的琼脂糖凝胶 80 V 电泳 200 min 后观察结果。

5. 序列分析:采用表 1 中引物对 VZV ORFs 1、31、51、62 进行扩增,PCR 产物经 DNA 凝胶回收试剂盒(大连宝生物工程有限公司)回收后送上海英俊生物技术有限公司测序。

结 果

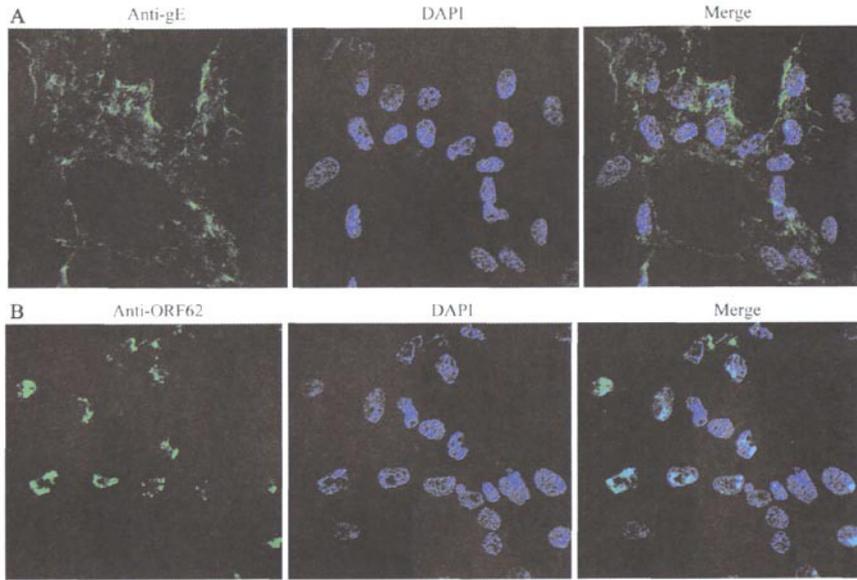
1. 病毒分离与鉴定:共采集 61 例患者的皮肤水疱液标本,接种到单层 HF 细胞后,病毒通常在 3 ~ 4 d 开始出现 CPE。取少量呈现 CPE 的细胞涂片,固定以后用 VZV 特异性 gE 抗体进行间接免疫荧光染色,阳性者呈现很强的胞浆着色(图 1A);用 ORF62 特异性抗体予以染色,则可见 ORF62 蛋白主要表达在受染细胞的细胞核中(图 1B)。共分离鉴定得到 49 株 VZV,其中 9 株来自水痘患者,40 株来自带状疱疹患者。38 例患者否认有 VZV 疫苗接种史。

2. ORF6(*AluI*)的 PCR-RFLP:ORF6 的 PCR 产物为 226 bp,如果该片段中存在 *AluI* 位点,则被切成 139 bp 和 87 bp 的 2 个片段。48 例患者的 VZV 临床分离株、MLS 和 p-Oka 在 ORF6 均含有 *AluI* 酶切位点记为 *AluI*⁺,所有疫苗和 1 例患者的 VZV 临床分离株(命名为 LG)没有相应的 *AluI* 酶切位点记为 *AluI*⁻(图 2)。

表 1 本研究中所使用的 PCR 引物

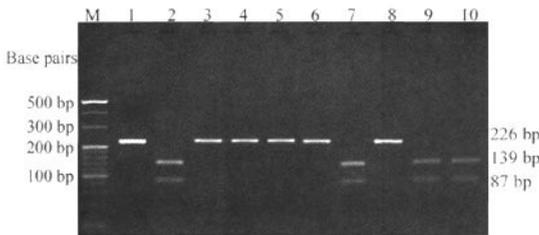
酶切位点	引物	引物序列(5'→3')	长度 (bp)	退火温度 (°C)
ORF6 (<i>AluI</i>) [*]	上游	CTGTTCGACAAAGGCCTCC	226	55
	下游	CACATAGAAACCCGGCAA		
ORF38 (<i>PstI</i>) [*]	上游	AAGTTTCAGCCAACGTGCCAATAAA	647	55
	下游	AGACGCGCTTAACGGGAAGTAACG		
ORF62 (<i>SmaI</i>) [*]	上游	TTCCCACCGCGGCACAAACA	268	55
	下游	GGTGTGCTGGTGTGGACGCG		
ORF62(<i>BssHII</i> 和 <i>NaeI</i>) [*]	上游	GATCAAAGCTTAGCGCAG	781	55
	下游	CCTATAGCATGGCTCCAG		
ORF1 [†]	上游	AAAAGCGACCCACCTCCCCG	894	55
	下游	TATTTTTGGGATCCGCAATGTC		
ORF31 [†]	上游	CTTTGGAGCGGACTATTTCC	1218	58
	下游	AATGGAGACACATGAGTAACGTAA		
ORF51 [†]	上游	ACGAATACCTGAAGCGTTGG	403	50
	下游	GAAGGCAGGTTAGGGATGTTT		
ORF62 [†]	上游	GCCCGCACAGACAGACAGACACTT	393	55
	下游	CAGACGACAGAGAACCGAT		

注:^{*}引物来自 Quintivan 等;[†]该引物用 primer premier 5.0 软件自行设计



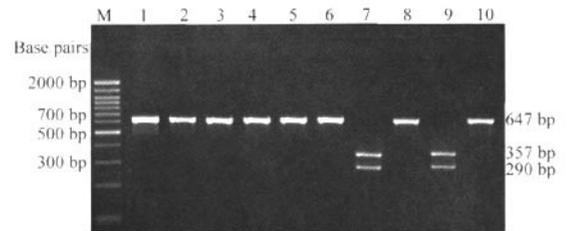
注: A: VZV糖蛋白gE; B: VZV早期蛋白ORF62

图1 VZV间接免疫荧光染色



注: M: 20 bp DNA Marker; 1: PCR产物未酶切; 2: p-Oka; 3: 上海疫苗; 4: 长春疫苗; 5: Varivax; 6: Varilrix; 7: MLS; 8: LG; 9: 其他临床分离株; 10: ZW

图2 ORF6 PCR产物Alu I酶切结果



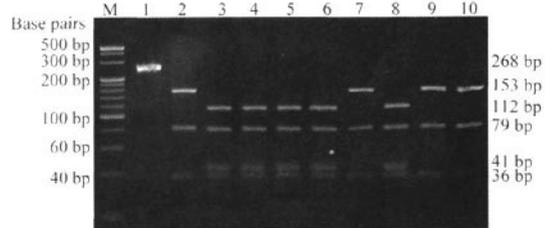
注: M: 100 bp DNA Marker; 1: PCR产物未酶切; 2: p-Oka; 3: 上海疫苗; 4: 长春疫苗; 5: Varivax; 6: Varilrix; 7: MLS; 8: LG; 9: 其他临床分离株; 10: ZW

图3 ORF38 PCR产物Pst I酶切结果

3. ORF38(*Pst*I)的PCR-RFLP: ORF38的PCR产物为647 bp, 如果该片段中存在*Pst*I位点, 则被切成357 bp和290 bp 2个片段。47例(92%)患者VZV临床分离株和MLS株在ORF38均含有*Pst*I酶切位点, 然而p-Oka、所有疫苗和另2例(8%)患者VZV临床分离株(其中1例为LG株, 另1例命名为ZW株)则没有相应的*Pst*I酶切位点(图3)。

4. ORF62(*Sma*I)的PCR-RFLP: ORF62(*Sma*I)的PCR产物为268 bp, 将其经*Sma*I酶切后凝胶电泳。结果显示48株临床分离株、p-Oka和MLS的酶切产物为153 bp、79 bp、36 bp, 表示为*Sma*I⁻; 疫苗和LG株的酶切产物为112 bp、79 bp、41 bp、36 bp, 表示为*Sma*I⁺, 即多个*Sma*I位点(图4)。

5. ORF62(*Bss*H II和*Nae*I)的PCR-RFLP: ORF62(*Bss*H II和*Nae*I)的PCR产物为781 bp, 将其



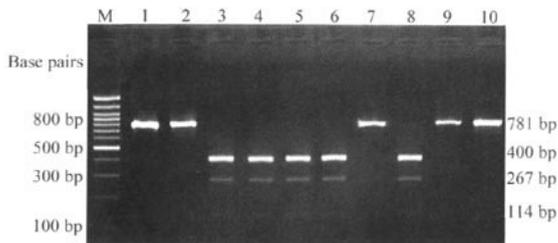
注: M: 20 bp DNA Marker; 1: PCR产物未酶切; 2: p-Oka; 3: 上海疫苗; 4: 长春疫苗; 5: Varivax; 6: Varilrix; 7: MLS; 8: LG; 9: 其他临床分离株; 10: ZW

图4 ORF62 PCR产物Sma I酶切结果

经*Bss*H II和*Nae*I双酶切后凝胶电泳。4种疫苗和LG株存在*Bss*H II和*Nae*I酶切位点, 被切成400 bp、267 bp、144 bp; 其他毒株不存在这两个酶切位点(图5)。

6. 序列分析: 将测序得到的VZV ORFs1、31、51、62序列以VZV国际标准株Dumas株(GenBank

access number X04370)作为参照通过生物信息学软件MEGA 4.02进行比对,将存在差异的SNP位点列举出来(图6)。



注: M: 100 bp DNA Marker; 1: PCR产物未酶切; 2: p-Oka; 3: 上海疫苗; 4: 长春疫苗; 5: Varivax; 6: Varilrix; 7: MLS; 8: LG; 9: 其他临床分离株; 10: ZW

图5 ORF62 PCR产物 *BssH* II 和 *Nae* I 双酶切结果

开放读码框 核苷酸位置	1				31	51	62	
	178	560	703	763	58595	59287	98734	105356
毒株								
Dumas	G	T	T	T	A	A	A	T
MLS	G	T	T	T	A	A	A	T
pOka	G	T	T	T	A	A	A	T
vOka	G	C	Y	Y	R	R	G	C
Varivax	C	C	C	C	G	A	A	Y
Varilrix	C	C	C	C	R	A	T	C
长春疫苗	G	C	C	C	A	G	G	C
上海疫苗	G	C	C	C	A	G	G	C
ZW	G	T	T	T	A	A	A	T
LG	C	C	T	T	A	A	G	C
其他分离株	G	T	T	T	A	A	A	T

Y 嘧啶 ■ 所有疫苗共有 SNP
R 嘌呤 ■ Varivax SNP
■ 野毒株的 SNP ■ Varivax and Varilrix SNP

注:核苷酸位置参照国际标准株Dumas株,v-Oka为Biken研究院的减毒疫苗株序列来自GenBank access number BD097171

图6 各毒株ORF 1、31、51、62序列中SNP比对

综上所述,PCR-RFLP显示4种疫苗均为 *Alu* I⁻ *Pst* I⁻ *Sma* I⁺ *BssH* II⁺ *Nae* I⁺, p-Oka酶切结果为 *Alu* I⁺ *Pst* I⁻ *Sma* I⁻ *BssH* II⁻ *Nae* I⁻, MLS酶切结果为 *Alu* I⁺ *Pst* I⁺ *Sma* I⁻ *BssH* II⁻ *Nae* I⁻; LG株酶切结果为 *Alu* I⁻ *Pst* I⁻ *Sma* I⁺ *BssH* II⁺ *Nae* I⁺与疫苗一致,ZW株酶切结果为 *Alu* I⁺ *Pst* I⁻ *Sma* I⁻ *BssH* II⁻ *Nae* I⁻与p-Oka一致,其他47例患者临床分离株为 *Alu* I⁺ *Pst* I⁺ *Sma* I⁻ *BssH* II⁻ *Nae* I⁻(表2)。序列分析显示默克公司、葛兰素史克公司和我国生产的疫苗之间存在一些差异,我国生产的疫苗和Biken研究院的减毒疫苗株v-Oka更接近。我们分离到的LG株为疫苗株,可能来自葛兰素史克公司的疫苗。

讨论

在水痘疫苗大量使用的情况下,监测VZV流行

表2 PCR-RFLP结果

病毒株	ORF6 <i>Alu</i> I位点	ORF38 <i>Pst</i> I位点	ORF62 <i>Sma</i> I位点	ORF62 <i>BssH</i> II位点	ORF62 <i>Nae</i> I位点
p-Oka	+	-	-	-	-
MLS	+	+	-	-	-
Vsrivax	-	-	+	+	+
Varilrix	-	-	+	+	+
长春疫苗	-	-	+	+	+
上海疫苗	-	-	+	+	+
LG	-	-	+	+	+
ZW	+	-	-	-	-
其他47例患者 临床分离株	+	+	-	-	-

注: + 存在酶切位点, - 缺失酶切位点

株的基因特征变得更有意义,除了能够调查当前流行的VZV野毒株的基因型,还可了解可能的疫苗反应,以及疫苗的使用是否对VZV的分子流行病学特征产生影响。在北美和欧洲,绝大多数VZV病毒株在ORF38中基因组核苷酸第69349位(SNP69349)都含有 *Pst* I酶切位点(*Pst* I⁺),在ORF54中(SNP95241)不含 *Bgl* I酶切位点(*Bgl* I⁻)^[8,9],而源自日本的疫苗,其SNP69349核苷酸A突变为G,失去了 *Pst* I酶切位点(*Pst* I⁻),SNP95241 T突变为G而形成了一个 *Bgl* I酶切位点(*Bgl* I⁺)。因此在早先的研究中,曾提出以 *Pst* I和 *Bgl* I双酶切来分野毒株和疫苗株^[10,11]。但是在日本有30%的病毒株为 *Pst* I⁻^[8],随后 *Pst* I⁻株在美国夏威夷和澳大利亚也相继被发现^[9,12],本研究发现我国也存在 *Pst* I⁻株。另外,随着人口流动增多原本 *Bgl* I⁻株占明显优势的北美和欧洲地区 *Bgl* I⁺株所占的比例正逐年增加^[13],因此这种方法已经不再适用。

水痘疫苗是通过减毒作用获得,尽管迄今对Oka疫苗得以减毒的分子机制尚未阐明,但是比对疫苗(v-Oka)与其亲本病毒株(p-Oka)的全基因发现42个核苷酸发生突变,其中超过1/3(15/42)的突变发生在ORF62中^[13]。位于ORF6中SNP5745的A突变为G,导致v-Oka在该位点的 *Alu* I酶切位点丧失。位于ORF62中SNP106262的A突变为C,导致v-Oka在该位点多出一个 *Sma* I酶切位点,SNP107136的T突变为C,导致v-Oka在该位点多出一个 *BssH* II酶切位点,SNP107252的T突变为C,导致v-Oka在该位点多出一个 *Nae* I酶切位点。因此,通过检测这些酶切位点存在与否,可以分野毒株和疫苗株。另外,通过减毒作用的疫苗株病毒并不是单个克隆,而是由多株基因差别很小的病毒形成的混合物,这使得不同生产厂家的疫苗基因也存在差异,但其预防

水痘的效果没有明显的不同^[13]。正是不同疫苗基因之间存在差异,使得研究疫苗的使用是否对VZV的分子流行病学特征产生影响成为可能。

疫苗株VZV引起疾病并非罕见,但主要是以接种者发生带状疱疹为主,且症状均较轻^[3-6]。疫苗株病毒传播到易感个体引起水痘的病例较为罕见^[14-16],目前已报道的该类病例具有的共同特征:①在家庭成员之间传播,如子女接种疫苗后,会引起对VZV没有免疫力的父母罹患水痘;②接种疫苗的儿童通常在接种部位会出现水疱或红斑等皮肤反应;③被传染者的水痘症状较轻。本研究在确认分离株为疫苗株后对患者病史进行调查,患者为一名23岁幼儿园教师,发病时症状较轻,体温37.8℃,周身分布50~100个水疱疹,无疫苗接种史。发病一周前该幼儿园有一名5岁男童右手臂出现带状疱疹,并与该教师有密切接触。该男童于一年前曾接种一人份水痘疫苗(Varilrix®葛兰素史克公司生产)。本研究分析结果也显示LG株在基因特征上更接近Varilrix,提示这可能是水痘疫苗发生二次传播(secondary transmission)的病例,与国外相关报道不同的是感染发生在公共场所,而非家庭内。

本研究显示,水痘疫苗和VZV临床分离株的基因特征存在较大差异,通过对ORF6和ORF62中Alu I、Sma I、BssH II、Nae I酶切位点的分析可以将疫苗株和野毒株区分开。但是要想进一步追踪疫苗株VZV的来源还需进一步分析不同疫苗所特有的单个核苷酸位点。鉴于在我国应用水痘减毒活疫苗预防VZV感染才刚刚起步,监控VZV临床分离株的分子特征,将有助于评价疫苗的引入是否对我国VZV流行病学特征产生影响。

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: 1548-1551.

[3] Uebe B, Sauerbrei A, Burdach S, et al. Herpes zoster by reactivated vaccine varicella-zoster virus in a healthy child. *Eur J Pediatr*, 2002, 161(8): 442-444.

[4] Hambleton S, Steinberg SP, LaRussa PS, et al. Risk of herpes zoster in adults immunized with varicella vaccine. *J Infect Dis*, 2008, 197(2): S196-199.

[5] Chaves SS, Haber P, Walton D, et al. Safety of varicella vaccine after licensure in the United States: experience from reports to the Vaccine Adverse Event Reporting System, 1995-2005. *J Infect Dis*, 2008, 197(2): S170-177.

[6] Galea SA, Sweet A, Beninger P, et al. The safety profile of varicella vaccine: a 10-year review. *J Infect Dis*, 2008, 197(2): S165-169.

[7] Chen JX. *Diagnostic virology*. Beijing: People's Medical Publishing House, 2008: 244-251. (in Chinese)
陈敬贤. *诊断病毒学*. 北京: 人民卫生出版社, 2008: 244-251.

[8] Takada M, Suzutani T, Yoshida I, et al. Identification of varicella-zoster virus strains by PCR analysis of three repeat elements and a *Pst* I⁻ site-less region. *J Clin Microbiol*, 1995, 33(3): 658-660.

[9] Loparev V, Gonzalez A, Deleon-Carnes M, et al. Global identification of three major genotypes of varicella-zoster virus: longitudinal clustering and strategies for genotyping. *J Virol*, 2004, 78(15): 8349-8358.

[10] Hawrami K, Breuer J. Analysis of United Kingdom wild-type strains of varicella-zoster virus: differentiation from the Oka vaccine strain. *J Med Virol*, 1997, 53(1): 60-62.

[11] LaRussa PS, Steinberg SP, Arvin A, et al. Polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism analysis of varicella-zoster virus isolates from the United States and other parts of the world. *J Infect Dis*, 1998, 178(1): S64-66.

[12] Loparev V, Rubtcova EN, Bostik V, et al. Identification of five major and two minor genotypes of varicella-zoster virus strains: a practical two-amplicon approach used to genotype clinical isolates in Australia and New Zealand. *J Virol*, 2007, 81(23): 12758-12765.

[13] Gomi Y, Sunamachi H, Mori Y, et al. Comparison of the complete DNA sequences of the Oka varicella vaccine and its parental virus. *J Virol*, 2002, 76(22): 11447-11459.

[14] Grossberg R, Harpaz R, Rubtcova E, et al. Secondary transmission of varicella vaccine virus in a chronic care facility for children. *J Pediatr*, 2006, 148(6): 842-844.

[15] Salzman MB, Sharrar RG, Steinberg S, et al. Transmission of varicella-vaccine from a healthy 12-month-old to his pregnant mother. *J Pediatr*, 1997, 131(1): 151-154.

[16] Brunell P, Takele A. Chickenpox attributable to a vaccine virus contracted from a vaccinee with zoster. *Pediatrics*, 2000, 106(2): 1-2.

(收稿日期:2009-11-03)

(本文编辑:张林东)