

文章编号: 1000-8020(2017)05-0695-05

·论著·

2012—2014年中国婴儿配方食品和谷基辅食 类食品及临床腹泻病例来源的 克罗诺杆菌种水平鉴定研究



甘辛 王伟 胡豫杰 李凤琴 毛旭 徐进¹

国家食品安全风险评估中心 卫生部食品安全风险评估重点实验室 北京 100021

摘要:目的 建立一种基于细菌RNA聚合酶 β 亚基编码基因(*rpoB*)的克罗诺杆菌种鉴定PCR方法,对不同来源的克罗诺杆菌进行种水平鉴定。方法 通过*rpoB*基因设计针对克罗诺杆菌7个种的引物,以9株参考菌株作为参照,对261株2012—2014年收集的我国婴儿配方食品和谷基辅食类食品及临床腹泻病例来源的克罗诺杆菌进行种水平鉴定。结果 9株参考菌株PCR结果与对应大小一致,261株克罗诺杆菌中的179株为阪崎克罗诺杆菌,56株为丙二酸盐克罗诺杆菌,13株为尤尼沃斯克罗诺杆菌,11株为都柏林克罗诺杆菌,2株为苏黎世克罗诺杆菌,分别占总菌株数的68.58%、21.46%、4.98%、4.21%和0.77%。结论 建立的克罗诺杆菌PCR方法种水平鉴定具有特异、便捷、灵敏等优势,可为我国食品安全克罗诺杆菌的风险监测和控制提供技术支持。

关键词: 克罗诺杆菌 PCR 食品安全 婴幼儿食品

中图分类号: R155.51 R378.2

文献标志码: A

Study on species identification of *Cronobacter* isolated from infant formula foods and cereal based foods and clinical diarrhea cases in 2012 – 2014 in China

Gan Xin, Wang Wei, Hu Yujie, Li Fengqin, Mao Xu, Xu Jin

Key Lab of Food Safety Risk Assessment, Ministry of Health, China National Centre for Food Safety Risk Assessment, Beijing 100021, China

Abstract: Objective To develop a *Cronobacter* species identification PCR method based on RNA polymerase beta subunit (*rpoB*) gene and identify species of *Cronobacter* isolated from different sources. **Methods** A total of 7 primer pairs based on the *rpoB* were design, and 9 standard strains were set as reference strains to identify species of 261 strains isolated from infant formula foods, cereal based foods and clinical diarrhea cases in 2012 – 2014 in China. **Results** The molecular weight of 9 standard strains were as same as expect, 179 of 261 *Cronobacter* isolates were *C. sakazakii*, 56 were *C. malonaticus*, 13 were *C. universalis*, 11 were *C. dublinensis*, 2 were *C. turicensis*, accounted for 68.58%, 21.46%, 4.98%, 4.21% and 0.77% of the total isolates, respectively. **Conclusion** The *Cronobacter* species identification PCR system is specific, convenient, sensitive. This system can provide technical support for *Cronobacter* risk

基金项目: 北京市自然科学基金(No. S150004)

作者简介: 甘辛 男 硕士 助理研究员 研究方向: 食品微生物

¹ 通信作者: 徐进 男 博士 研究员 研究方向: 食品微生物 E-mail: xujin@cfsa.net.cn

surveillance and control in China.

Key words: *Cronobacter*, PCR, food safety, infant formula foods

克罗诺杆菌(*Cronobacter* spp.) 以前称其为阪崎肠杆菌(*Enterobacter sakazakii*), 是一种条件致病性革兰阴性杆菌。该菌最初被认为是黄色阴沟肠杆菌(*Enterobacter cloacae*), 1980 年更名为阪崎肠杆菌, 2008 年又被重新定义为克罗诺杆菌属, 2004 年经世界粮农组织和世界卫生组织评估, 将克罗诺杆菌和沙门菌共同列为婴幼儿配方粉中的 A 类致病菌^[1]。目前根据 DNA 杂交、16S rRNA 测序、表型分型等研究, 克罗诺杆菌属又被分为 7 个种和 3 个亚种, 即阪崎克罗诺杆菌(*C. sakazakii*)、丙二酸盐克罗诺杆菌(*C. malonaticus*)、苏黎世克罗诺杆菌(*C. turicensis*)、莫金斯克罗诺杆菌(*C. muytjensii*)、都柏林克罗诺杆菌(*C. dublinensis*)、康迪蒙提克罗诺杆菌(*C. condimentii*)、尤尼沃斯科罗诺杆菌(*C. universalis*)及都柏林克罗诺杆菌都柏林亚种(*C. dublinensis* subsp. *dublinensis*)、都柏林克罗诺杆菌洛桑亚种(*C. dublinensis* subsp. *lausannensis*)、都柏林克罗诺杆菌乳粉亚种(*C. dublinensis* subsp. *lactaridi*)^[2]。该属内的 7 个种均有致病性, 且不同种之间生物学特性、对环境的抗性、流行病学分布及致病性等有较大差异, 与新生儿感染有关的主要有阪崎克罗诺杆菌、丙二酸盐克罗诺杆菌和苏黎世克罗诺杆菌, 其中以阪崎克罗诺杆菌为主。近年来发现婴儿配方粉中阪崎克罗诺杆菌污染与新生儿脑膜炎发生有关^[3], 但因为认知的局限性, 自克罗诺杆菌被发现至今, 国际上关于该菌感染致病的病例较少, 而国内克罗诺杆菌的临床感染病例更为罕见, 缺乏疾病发生的流行病学资料。

传统的生化方法鉴别克罗诺杆菌 7 个种的实验步骤繁琐, 时间较长, 尚不能适应监管和企业的内部质控的需求, 而目前针对种水平鉴定的研究主要基于测序技术, 虽然特异性好, 但是耗时长, 成本高, 因此有必要建立一种快速、稳定、可重复的克罗诺杆菌属种水平鉴定方法, 以了解我国婴幼儿食品中克罗诺杆菌属内各个种的污染特性、分布特征及与食源性疾病发生的相关性, 揭示我国食品污染和临床感染的克罗诺杆菌主要流行种。本研究通过条件优化, 建立了可靠的克罗诺杆菌种水平鉴定方法, 并以国家食品安全污染物风险监测中获得的婴幼儿食品及临床腹泻样品中分离的克罗诺杆菌为对象进行种水平验证, 以了解我国

克罗诺杆菌主要流行种在我国婴幼儿食品中的分布情况。

1 材料与方法

1.1 菌株来源

本研究用 8 株克罗诺杆菌标准菌株包括阪崎克罗诺杆菌(ATCC 29544)、丙二酸盐克罗诺杆菌(DSM 18702)、苏黎世克罗诺杆菌(DSM 18703)、都柏林克罗诺杆菌都柏林亚种(DSM 18705)、都柏林克罗诺杆菌洛桑亚种(DSM 18706)、都柏林克罗诺杆菌乳粉亚种(DSM 18707)、尤尼沃斯科罗诺杆菌(NCTC 9529)、莫金斯克罗诺杆菌(ATCC 51329)均为本室保存, 1 株康迪蒙提克罗诺杆菌参考菌株为爱尔兰都柏林大学惠赠。248 株克罗诺杆菌来源于 2012—2014 年国家食品安全污染物风险监测网的 27 个省(直辖市、自治区)婴幼儿配方食品和谷基辅食类食品, 菌株数分别为 56 株和 192 株, 13 株为 2014—2015 年北京市丰台区临床腹泻粪便样品分离株。

1.2 试剂和仪器

脑心浸液肉汤(BHI)、脑心浸液琼脂(BHA)、阪崎肠杆菌显色培养基(DFI)、胰蛋白胨大豆琼脂(TSA)均购自北京陆桥技术股份有限公司, 2 × GoTaq Green Master Mix 购自美国 Promega 公司, 细菌基因组 DNA 提取试剂盒购自北京天根生化科技有限公司。

PCR 扩增仪 C1000、凝胶成像系统 Gel Doc 均购自美国 BIO-RAD 公司, 比浊仪 DensiCHEK-plus (法国生物梅里埃公司)、生化培养箱 IncuCell (德国 MMM 公司)、VITEK 2 COMPACT 全自动微生物分析仪(法国生物梅里埃公司)、电子天平 PL602-L(梅特勒-托利多仪器上海有限公司)、高压灭菌锅 SQ810C(重庆雅马拓科技有限公司)。

1.3 方法

1.3.1 菌株的活化与鉴定 将 -80 °C 保存的全部标准待测菌株接种于 5 mL BHI 肉汤管中, 37 °C 培养过夜, 将培养物划线接种于 BHA 平板, 37 °C 培养 24 h。挑取单菌落, 划线接种于 DFI 平板, 37 °C 培养 24 h。挑取平板上生长的绿色单菌落, 划线接种于 TSA 平板, 25 °C 培养 48 h。从 TSA 平板上挑取 2~3 个新鲜黄色菌落, 置于 3 mL 0.85% 的无菌生理盐水比浊管中制成混悬液, 用微量紫外分光光度计调整菌悬液至 0.5 麦氏单

位,用 VITEK 2 COMPACT 全自动微生物分析仪进行鉴定。

1.3.2 基因组 DNA 提取 按照商品化细菌 DNA 提取试剂盒的说明提取细菌 DNA,备用。

1.3.3 PCR 扩增 扩增引物通过克罗诺杆菌属 7

个种的 *rpoB* (RNA polymerase beta subunit) 基因序列^[3]设计,由上海英骏生物技术有限公司合成,各菌扩增所需的引物序列见表 1。配制 25 μL 反应体系,其中 2 × buffer 12.5 μL,上下游引物(10 μmol/L)各 1 μL,样品 DNA 1 μL, ddH₂O 9.5 μL。

表 1 克罗诺杆菌种水平鉴定引物序列及 PCR 反应条件

种名	引物编号	引物序列(5'→3')	预变性	变性	退火	延伸	片段大小/ bp
康迪蒙提克罗诺杆菌	Con-F	AAC GCC AAG CCA ATC TCG	95 °C	95 °C	58 °C	72 °C	689
	Con-R	GTA CCG CCA CGT TTT GCT	2 min	1 min	30 s	1 min	
阪崎克罗诺杆菌	Sak-F	ACG CCA AGC CTA TCT CCG CG	94 °C	94 °C	69 °C	72 °C	514
	Sak-R	ACG GTT GGC GTC ATC GTG	3 min	1 min	30 s	1 min	
丙二酸盐克罗诺杆菌	Mal-F	CGT CGT ATC TCT GCT CTC	94 °C	94 °C	64 °C	72 °C	251
	Mal-R	AGG TTG GTG TTC GCC TGA	3 min	1 min	30 s	30 s	
苏黎世克罗诺杆菌	Tur-F	CGG TAA AAG AGT TCT TCG GC	94 °C	94 °C	61 °C	72 °C	628
	Tur-R	GTA CCG CCA CGT TTC GCC	3 min	1 min	30 s	1 min	
都柏林克罗诺杆菌	Dub-F	GCA CAA GCG TCG TAT CTC C	94 °C	94 °C	62 °C	72 °C	418
	Dub-R	TTG GCG TCA TCG TGT TCC	3 min	1 min	30 s	30 s	
莫金斯克罗诺杆菌	Muy-F	TGT CCG TGT ATG CGC AGA CC	94 °C	94 °C	67 °C	72 °C	289
	Muy-R	TGT TCG CAC CCA TCA ATG CG	3 min	1 min	30 s	30 s	
尤尼沃斯克罗诺杆菌	Uni-F	ACA AAC GTC GTA TCT CTG CG	94 °C	94 °C	61 °C	72 °C	506
	Uni-R	AGC ACG TTC CAT ACC GGT C	3 min	1 min	30 s	30 s	

1.3.4 PCR 反应体系优化 为防止退火温度太低导致的非特异性扩增,设计梯度 PCR 反应程序,最终扩增条件见表 1,30 个循环,再延伸 5 min。

1.3.5 PCR 扩增产物检测 利用琼脂糖凝胶电泳对 PCR 扩增产物进行鉴定,配制 1% 琼脂糖凝胶,取 10 μL PCR 产物,以 100 bp DNA Ladder 为参照,120 V 恒压电泳 30 min,用凝胶成像系统观察结果。

1.3.6 方法验证 将 2012—2014 年各省从食品中分离的克罗诺杆菌和北京丰台区临床样本中分离的克罗诺杆菌共计 261 株菌按照 1.3.1 的方法活化,提取 DNA 后,按照优化的 PCR 方法进行鉴定。

2 结果

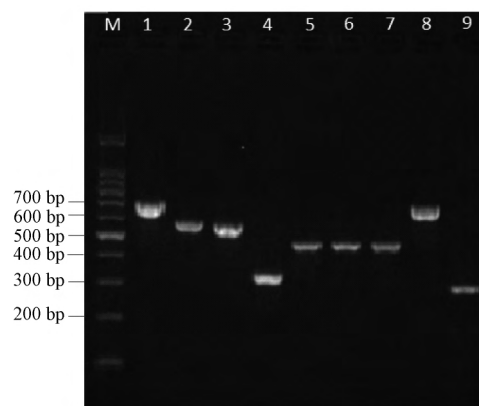
2.1 退火温度的选择

鉴于阪崎克罗诺杆菌、丙二酸盐克罗诺杆菌和莫金斯克罗诺杆菌三者的鉴别较困难,故对 PCR 的反应条件进行优化,其中阪崎克罗诺杆菌设置退火温度依次为 65、66、67、68、69 和 70 °C,丙二酸盐克罗诺杆菌设置退火温度依次为 60、61、62、63、64、65 和 66 °C,莫金斯克罗诺杆菌设置退火温度依次为 61、62、63、64、65、66 和 67 °C,经过优化,最终选取 PCR 鉴定阪崎克罗诺杆菌的退火温度为 69 °C,丙二酸盐克罗诺杆菌的退火温度为 64 °C,莫金斯克罗诺杆菌的退火温度为 67 °C,此时 PCR 扩增效果最佳,且无非特异性

条带。

2.2 9 株克罗诺杆菌标准菌株检测结果

用 PCR 法对 9 株克罗诺杆菌标准菌株进行检测,PCR 产物大小与其种型对应片段大小一致(图 1),且无任何非特异性扩增,其中阪崎克罗诺杆菌的引物无法区分丙二酸盐克罗诺杆菌、苏黎世克罗诺杆菌和尤尼沃斯克罗诺杆菌,因此还需通过针对这 3 个种菌设计的引物的 PCR 结果进行区分,当丙二酸盐克罗诺杆菌、苏黎世克罗诺杆菌和尤尼沃斯克罗诺杆菌 PCR 反应任一结果为阳性时可判定为该引物对应的种,均为阴性时为阪崎克罗诺杆菌。



M: 100 bp DNA ladder; 1: 康迪蒙提克罗诺杆菌; 2: 阪崎克罗诺杆菌; 3: 尤尼沃斯克罗诺杆菌; 4: 莫金斯克罗诺杆菌; 5: 都柏林克罗诺杆菌乳粉亚种; 6: 都柏林克罗诺杆菌洛桑亚种; 7: 都柏林克罗诺杆菌都柏林亚种; 8: 苏黎世克罗诺杆菌; 9: 丙二酸盐克罗诺杆菌

图 1 9 株克罗诺杆菌标准菌株种特异性引物扩增结果

2.3 方法验证结果

用所建方法对 261 株克罗诺杆菌的验证结果显示,179 株为阪崎克罗诺杆菌,占总菌株数的 68.58%,56 株为丙二酸盐克罗诺杆菌,占总菌株数的 21.46%,13 株为尤尼沃斯科罗诺杆菌,占总

菌株数的 4.98%,11 株为都柏林克罗诺杆菌,占总菌株数的 4.21%,2 株为苏黎世克罗诺杆菌,占总菌株数的 0.77%。13 株临床分离的克罗诺杆菌中,阪崎克罗诺杆菌 8 株,丙二酸盐克罗诺杆菌 4 株,尤尼沃斯科罗诺杆菌 1 株。具体见表 2。

表 2 食品及临床来源的克罗诺杆菌种水平鉴定结果统计表

种名	来源		
	婴幼儿配方粉	谷类辅食	临床分离
阪崎克罗诺杆菌	82.14% (46/56)	65.10% (125/192)	61.54% (8/13)
丙二酸盐克罗诺杆菌	8.93% (5/56)	24.48% (47/192)	30.77% (4/13)
都柏林克罗诺杆菌	3.57% (2/56)	4.69% (9/192)	0
尤尼沃斯科罗诺杆菌	3.57% (2/56)	5.21% (10/192)	7.69% (1/13)
苏黎世克罗诺杆菌	1.79% (1/56)	0.52% (1/192)	0
康迪蒙提克罗诺杆菌	0	0	0
莫金斯科罗诺杆菌	0	0	0

3 讨论

目前国内外针对克罗诺杆菌种水平鉴定的研究较多,包括 16S rDNA 测序、*recN* 基因测序以及 *rpoB* 基因测序^[3-5],该类方法都基于基因测序技术,具有可信度高、重复性好的特点。本研究选取的 *rpoB* 基因编码 RNA 聚合酶 β 亚基,与 16S rDNA 一样被用于相近菌株的分析和鉴定。本研究针对 *rpoB* 基因设计 7 对种特异性引物,采用 PCR 法进行种水平鉴定,具有高效、便捷、灵敏等优势,并通过 261 株食品和临床样品分离的克罗诺杆菌进行验证,179 株(68.58%)为阪崎克罗诺杆菌,56 株(21.46%)为丙二酸盐克罗诺杆菌,13 株(4.98%)为尤尼沃斯科罗诺杆菌,11 株(4.21%)为都柏林克罗诺杆菌,2 株(0.77%)为苏黎世克罗诺杆菌。其中阪崎克罗诺杆菌是优势种,与国内外对克罗诺杆菌种鉴定的研究结果一致^[4]。目前国外已有研究通过 *rpoB* 基因进行克罗诺杆菌种鉴定,国内相关的研究还比较罕见,而且更多的是基于基因测序技术,但该方法成本相对较高,同时对实验人员技术要求严格,需要进行大量的数据分析工作,耗时较长。*rpoB* 基因编码 RNA 聚合酶 β 亚基目前已大量应用于肠杆菌科分类^[5]。本研究建立在 PCR 的基础上通过对比克罗诺杆菌 7 个种之间基因的特异性位点设计引物,技术成熟且成本较低,技术易掌握,也易在全国各地推广使用。

验证结果显示,我国婴儿配方食品、谷基辅食和临床分离株中阪崎克罗诺杆菌(179 株)和丙二酸盐克罗诺杆菌(56 株)是主要的流行种,这与国内外的研究结果基本一致^[4,6-7]。目前研究发现阪崎克罗诺杆菌、丙二酸盐克罗诺杆菌和苏黎世克罗诺杆菌与人类疾病存在关联^[7],其中阪崎克

罗诺杆菌和丙二酸盐克罗诺杆菌致病性最强^[8]。阪崎克罗诺杆菌引起的食源性疾病在美国、荷兰、加拿大、德国等 20 多个发达国家均有发生,在少数发展中国家如印度、菲律宾等也有报道^[9]。高风险人群主要是婴幼儿,特别是早产儿、低出生体重儿和免疫力低下的婴幼儿。全球阪崎克罗诺杆菌感染病例中,80% 以上为 1 岁以下婴儿,半数以上为不足 1 月的新生儿,病死率为 40%~80%,幸存者多遗留严重的神经、发育后遗症。近年来,成人尤其是老年人以及用免疫抑制药物治疗的癌症患者、艾滋病病毒感染等免疫力低下者中阪崎克罗诺杆菌感染率呈上升趋势。而本研究验证所用的临床腹泻病人分离克罗诺杆菌中也以这两种为主。与其他肠杆菌科细菌相比,克罗诺杆菌显示出极强的耐干燥能力和渗透压抗性,使其能在水分活性 0.2 左右的配方粉中存活 2 年以上。我国食品安全国家标准 GB 10765—2010《婴儿配方食品》规定供 6 月龄以下婴儿食用的配方粉中克罗诺杆菌不得检出,鉴于该菌在产品中的低污染率,因此常规监测中需要灵敏特异的种水平鉴定方法,本研究所建方法特异性较高,可为克罗诺杆菌的监测和控制提供技术支持。

参考文献

- JARADAT Z W, AL MOUSA W, ELBETIEHA A, et al. *Cronobacter* spp.: opportunistic foodborne pathogens. A review of their virulence and environmental-adaptive traits [J]. J Med Microbiol, 2014, 63: 1023-1037.
- STRYDOM A, CAWTHORN D M, CAMERON M, et al. Species of *Cronobacter*: a review of recent advances in the genus and their significance in infant formula milk [J]. Inter Dairy J 2012, 27(1/2): 3-12.

(下转第 704 页)

看电视、阅读、玩电脑游戏的时间合计在 3 h 以上^[3],而丹麦研究结果显示 2010 年丹麦 25 岁以上居民每天闲暇静态活动时间为 3.6 h^[9],两个国家居民的静态活动时间均高于中国成年居民。

静态活动状况与性别、年龄、以及社会经济因素等有关,且社会经济水平高的人群静态活动的时间更长^[7]。研究结果显示,教育程度高、居住在城市、家庭人均年收入在 ≥ 1 万元的人群的静态活动时间和 2 h 及以上静态活动所占的比例高于其他人群,结果与国内其他研究的结果一致^[1,4-5]。闲暇时间女性的静态活动的时间显著低于男性,可能的原因是女性业余从事更多的家务劳动;低年龄人群的静态活动时间长,长时间静态活动所占的比例高,可能原因是该人群更容易接受“现代”的以视频为主的娱乐活动,从而比其他年龄人群的静态活动的时间更长^[9];未婚人群比有配偶和离异丧偶人群的静态活动时间长,可能是因为未婚意味着业余时间的家务劳动少,同时更多的时间用在了静坐为主的娱乐活动中。

除了人口统计学指标,影响身体活动的还有环境因素、社区规划、政策法规等社会决定因素,这些因素对静态活动的影响,需要在未来的研究进一步探讨。研究未对闲暇静态活动进行详细分类,对于指导人们促进身体活动、制定切实可行的干预措施存在一定的欠缺。

综上所述,为了遏制与身体活动有关的慢性疾病的流行,需要鼓励人们减少静态活动的时间,增加中等以上强度的身体活动,对于促进人群健康有重要意义。

参考文献

[1] 刘爱玲,胡小琪,崔朝辉,等. 我国成年居民闲暇

静态活动现状及影响因素分析[J]. 营养学报, 2008, 30(4): 345-349.

[2] WHO. Physical inactivity a leading cause of disease and disability, warns WHO [DB/OL]. [2016-04-10]. <http://www.who.int/mediacentre/news/releases/release23/en/>.

[3] United States Department of Agriculture. American time use survey—2014 results[DB/OL]. [2016-04-10]. <http://www.bls.gov/tus>.

[4] 陈晓蓉,姜勇,王丽敏,等. 2010 年中国成年人业余锻炼和业余静态行为情况分析[J]. 中华预防医学杂志, 2012, 46(5): 399-405.

[5] 张梅,陈晓蓉,王志会,等. 2010 年中国老年人业余锻炼及静态行为调查[J]. 中华流行病学杂志, 2014, 36(3): 242-246.

[6] 赵丽云,马冠生,朴建华,等. 2010-2012 中国居民营养与健康状况监测总体方案[J]. 中华预防医学杂志, 2016, 50(3): 204-208.

[7] BRUG J, CHINAPAW M. Determinants of engaging in sedentary behavior across the lifespan; lessons learned from two systematic reviews conducted within DEDIPAC[J]. Int J Behav Nutr Phys Act, 2015, 12(1): 134.

[8] NG S W, HOWARD A G, WANG H J, et al. The physical activity transition among adults in China: 1991-2011[J]. Obes Rev, 2014, 15(Suppl 1): 27-36.

[9] AADAHL M, ANDREASEN A H, HAMMER-HELMICH L, et al. Recent temporal trends in sleep duration, domain-specific sedentary behaviour and physical activity: a survey among 25-79-year-old Danish adults[J]. Scand J Public Health, 2013, 41(7): 706-711.

收稿日期: 2016-05-10

(上接第 698 页)

[3] YAN Q, WANG J, GANGIREDLA J, et al. Comparative genotypic and phenotypic analysis of *Cronobacter* species cultured for four powdered infant formula production facilities: indication of pathoadaptation along the food chain[J]. Appl Environ Microbiol 2015, 81(13): 4388-4402.

[4] 田雪,王娉,赵勇胜,等. 克罗诺杆菌种间鉴定 recN 基因方法建立[J]. 中国公共卫生, 2015, 31(1): 63-66.

[5] 周胜利,黄佳,晁爱敏,等. 基于 rpoB 基因的阪崎克罗诺杆菌分子检测体系的建立及应用[J]. 安全与环境学报 2012, 4(12): 158-161.

[6] 王红,黄彦,周艳,等. 广西市售婴儿食品中克罗

诺菌分离株基因特征及进化分类鉴定[J]. 中国食品卫生杂志 2016, 28(1): 6-10.

[7] SHUKLA S, LEE G, SONG X, et al. Detection of *Cronobacter Sakazakii* in powdered infant formula using an immunoliposome-based immunomagnetic concentration and separation assay[J]. Sci Rep, 2016, 6: 34721.

[8] JASON J. The roles of epidemiologist, laboratorians, and public health agencies in preventing invasive *Cronobacter* infection[J]. Frontiers Pediatr 2015, 3: 110.

[9] 梁鹰,王红戟. 阪崎肠杆菌研究进展[J]. 中国微生物生态学杂志 2008, 20(4): 418-420.

收稿日期: 2016-12-06