

论著·临床研究

TaqMan 荧光探针技术检测不同血清型 B 群链球菌的方法建立及评价*

江 凡,王飞玲,刘小月,路瑞静,周喜友,邹建华[△]
(深圳市宝安区妇幼保健院检验科,广东深圳 518100)

摘要:目的 建立基于 TaqMan 荧光探针技术,对不同血清型 B 群链球菌(GBS)鉴定的分子方法,为后续研究多重荧光探针技术检测不同血清型 GBS 奠定基础。方法 根据不同血清型荚膜多糖(CPS)序列的差异设计引物和探针,用实时荧光定量 PCR 扩增 CPS 序列,建立不同血清型的 GBS 分型方法,从灵敏度、特异度及临床分离株检测等方面对该方法进行评价,并与胶乳凝集试验结果比较。结果 同一血清型 GBS 的 DNA 的对数浓度与循环阈值(Ct)呈良好的线性相关,该方法的检测下限均为 1 pg/ μ L,一种探针只能检测对应血清型的 GBS。10 株标准菌株的 TaqMan 荧光探针技术检测结果与胶乳凝集试验结果一致。结论 TaqMan 荧光探针技术是一种简单、快速、具有较高灵敏度和特异度的检测 GBS 血清型的方法,对临床分离株的分型优于乳胶凝集试验。

关键词: TaqMan 荧光探针; 实时荧光定量聚合酶链反应; B 群链球菌

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2018.04.016

中图法分类号: R446.5

文章编号: 1673-4130(2018)04-0438-05

文献标识码: A

**Establishment and evaluation of different serotypes group B streptococcus
method by TaqMan fluorescent probe technique***

JIANG Fan, WANG Feiling, LIU Xiaoyue, LU Ruijing, ZHOU Xiyu, Zou Jianhua[△]

(Department of Clinical Laboratory, Maternity and Child Health Care Institute of
Baoan District, Shenzhen, Guangdong 518100, China)

Abstract: **Objective** To establish a molecular method for the identification of different serotypes of group B streptococcus (GBS) based on TaqMan fluorescence probe technology, and to lay the foundation for the subsequent study of multiple fluorescent probe technology to detect different serotypes of GBS. **Methods** Primers and probes were designed according to the different serotypes of capsular polysaccharide (CPS). CPS sequences were amplified by real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction. GBS classification methods of different serotypes were established. The results were compared with latex agglutination test and the method was evaluated from the aspects of sensitivity, specificity and detection of clinical isolates. **Results** The logarithmic concentration of DNA in the same serotype GBS was linearly correlated with the value of Ct. The detection limit of this method is 1 pg/ μ L, a probe could only detect the corresponding serotype GBS. The results of TaqMan fluorescence probe test of 10 strains were consistent with the results of latex agglutination test. **Conclusion** TaqMan fluorescence probe technique is a simple, rapid, highly sensitive and specific method for the detection of different GBS serotypes, and it is better than latex agglutination test for the classification of clinical isolates.

Key words: TaqMan fluorescent probe; real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction; group B streptococcus

B 群链球菌(GBS)为条件致病菌,又名无乳链球菌,常寄生于女性阴道和直肠,是围产期母婴感染的主要病原菌之一,可导致新生儿肺炎、脑膜炎、败血症等,严重者可危及生命^[1-3]。GBS 包含多种致病因子,

其中荚膜多糖(CPS)为关键致病因子之一。根据 CPS 差异,可将 GBS 分为 10 种血清型,包括 I a、I b、II ~ IX 型^[4]。血清学分型与 GBS 致病性、疫苗有效性,以及流行病学研究均具有重要意义^[5]。传统的血清型

* 基金项目:深圳市知识创新计划项目(JCYJ20150403105513694)。

作者简介:江凡,男,副主任技师,主要从事免疫学及检验方法学研究。 [△] 通信作者, E-mail: BAFYJY@163.com。

本文引用格式:江凡,王飞玲,刘小月,等. TaqMan 荧光探针技术检测不同血清型 B 群链球菌的方法建立及评价[J]. 国际检验医学杂志, 2018, 39(4): 438-442.

分型方法主要是免疫学方法,其中胶乳凝集试验被认为是 GBS 血清分型的“金标准”^[6]。免疫学检测方法灵敏度低,大批量标本检测成本高。目前分子分型的方法多涉及两种不同技术,如聚合酶链反应(PCR)和测序,PCR 和杂交,PCR 和酶切等,操作较为复杂,技术上也要求较高^[7-8]。TaqMan 探针技术具有高特异度、高灵敏度,还可以完全闭管操作等特点^[9],本研究用 TaqMan 探针检测不同血清型的 GBS,并对该方法进行综合评价,为下一步研究多重荧光探针检测不同血清型 GBS 奠定基础。

1 材料与方法

1.1 菌株来源 10 种血清型的 GBS 标准菌株,均购于美国典型菌种保藏中心,本实验室临床标本分离的 GBS 29 株。

1.2 仪器与试剂 哥伦比亚血平板(法国梅里埃公司)、GBS 胶乳凝集试剂盒(丹麦哥本哈根血清研究所)、细胞 DNA 提取试剂盒(北京天根公司)、Phoenix™-100 全自动细菌鉴定仪(美国 BD 公司)、MALDI Biotyper 质谱仪(德国布鲁克公司)、TaqMan 通用 PCR 扩增预混试剂(美国 ABI 公司)、核酸蛋白分析仪(美国伯乐公司)、ABI7500 PCR 仪(美国 ABI 公司)。

1.3 菌株鉴定 10 种血清型的 GBS 标准菌株和 29 株临床菌株均转种于哥伦比亚血平板上,37℃培养 16~18 h。参照 GBS 胶乳凝集试剂盒的操作程序,对标准菌株进行血清学验证。用 Phoenix™-100 细菌鉴定仪和 MALDI Biotyper 质谱仪对临床菌株进行初步鉴定。

1.4 细菌 DNA 提取 根据天根细菌 DNA 提取试

剂盒的操作步骤,提取标准菌株 DNA,同时提取 1.3 步骤中鉴定结果为 GBS 的临床菌株的 DNA,外送生工(上海)公司进行测序分析。用核酸蛋白分析仪将所有菌株的 DNA 质量浓度调整为 10 ng/μL,保存于-20℃备用。

1.5 引物和探针合成 根据 GenBank 数据库里检索到 10 种血清型的 GBS 标准菌株的序列结果,用 primer5.0 软件设计不同血清型 GBS 的 CPS 引物,用 Beacon Designer7.0 软件设计探针。引物和探针由 ABI 公司合成。具体引物和探针分别见表 1、2。

1.6 不同血清型 GBS 标准菌株 PCR 扩增 使用 ABI7500PCR 仪进行扩增,反应体系为:TaqMan 通用 PCR 扩增预混试剂 10 μL,ddH₂O 7.4 μL,上游引物、下游引物、探针各 0.2 μL(均为 100 μmol/L),模板 2 μL。反应条件:50℃孵育 2 min,95℃预变性 10 min;95℃30 s,60℃1 min,35 个循环。每株菌株做 3 个重复循环,每次实验均设置阴性对照(DNA 模板用 ddH₂O 替代)。阳性结果判断标准为循环阈值(Ct)<30。

1.7 灵敏度检测 将 DNA 浓度为 10 ng/μL 的标准菌株,进行 10 倍浓度梯度稀释,建立 6 个浓度梯度,依次为:10 ng/μL、1 ng/μL、100 pg/μL、10 pg/μL、1 pg/μL、100 fg/μL,均按照 1.6 步骤进行扩增,每株做 3 个重复循环。

1.8 特异性检测 按照 1.6 的反应体系,加入 1 种血清型对应的引物和探针,分别加入 10 种不同血清型的 DNA 模板(1 种血清型的引物和探针对应 10 组实验),每组做 3 个重复循环。

表 1 CBS 血清学分型的引物

引物	序列(5'→3')	片长(bp)	NCBI 编号
I a-F	GTT TAA AAA TCC TGA TTT TGA TAG AAT TTT AGC AGC TTT TAA C	207	CP000114.1
I a-R	CTG ATA TTT TGA ATA TTA TTA TGC AAA CAA TAA TAA TAT GTT CCC CCT A		
I b-F	GTA TTA AAT TCG TTA TTT AGA AGT CCA GAA TTT CAT AGA GTC ATT GC	195	FO393392.1
I b-R	GGC ATA ATA ATA TAG AAA TCC TAA ACA AGA CA AAA TAA TTG CAT TAA AC		
II-F	CAC ATA TAT ATT AAA GTT CAC CCT AGA GAT AAC ATT GAC TAC TCT AAT C	151	AAJ001000077.1
II-R	CTA ATG CCG TGG AAA AAT ATG TAA TCC CAA CAT CAA ATT		
III-F	GGA ATT GTT CTT TAT TTT TCT GCC T	170	AL766849.1
III-R	ACT ATA CCA AAA GTT GAG AAT AAT AAT ACA ATA CTC CAA TGA		
IV-F	GAA GAA AAT ATA TAT TTG CCA TAC AGT ATA TCA TCT CCT TAT TAC AAT TAT C	159	AF355776.1
IV-R	CAT AGA ATA CCT TCT TTA TTG GTA CGT TTA CAT AAA TCA TC A ATA TTA AC		
V-F	CAA AAT TCA ATG AGA GAA TGT TGT ATT TTT TTG AGG CAA TTC	153	AE009948.1
V-R	CAA TCA TCT TCC CAC ATA TAT CTA TTC CAC CAA ATA CTT C		
VI-F	GAC AGT CTA TTA CGA AAG TAT AAG AGC GAT T	219	HF952106.1
VI-R	AGC TTG TAG ATT ATC CTG TTT TGT TTG ATA GCT TCT CTA TAT AG		
VII-F	GAG GGC TTA CCT CAC GAC AGG AGA AGT AAA AAA TAT AAA G	160	AY376403.1
VII-R	GCT GCG TTA ATA ACA ATA CTG ACT TTG GAG C		
VIII-F	GAC TAA TGG TTA AGT ATG CTA ACT TGC TAA TTT GTG ATA GTA A	152	AY375363
VIII-R	CTT GTC CTT AAA ATT GTG TTT TGA CTT TGT CAG ATC AGT C		
IX-F	CAT TGA GCA AAG AGA AAA CAG TAT ATG TCA AAG GGC	128	CGBY01000002
IX-R	ATG TTC AAG GAT AAA ATC TCT ATT ATG TTG CAT TGC TTC A		

表 2 GBS 血清学分型的荧光探针

探针	序列(5'→3')
I a-P	6-FAM-TCG TTG ATT/ZEN/ATC GGT ATA GTA TCA TTG GCT-IABkFQ
I b-P	6-FAM-TGC ATT CAA/ZEN/TTC ACT GGC AGT AGG G-IABkFQ
II -P	6-FAM-AAT GCA ACA/ZEN/GTA ATA CAA AGG AAC ATC CCT-IABkFQ
III -P	6-FAM-ATG TTA CAC/ZEN/GCT CTT TGA GGA AAT AGA TCC-IABkFQ
IV -P	6-FAM-AGG GAA CAG/ZEN/AGG AGA TCA ATA ATT ATA TTG GC-IABkFQ
V -P	6-FAM-ATT TTC CAC/ZEN/ATA ATA CAT CTT TAA TCT CTG CTG T-IABkFQ
VI -P	6-FAM-CCC TCC AGT/ZEN/GTG GGA ATA TTT TTA GGT TCA C-IABkFQ
VII -P	6-FAM-AGT CTT ACC/ZEN/CAA GAA CAA AAG TCT CTG ATT-IABkFQ
VIII -P	6-FAM-ATG CTC CTA/ZEN/AAA CAA CCT ACA TCG CCT ATG-IABkFQ
IX -P	6-FAM-AGT ACT ACC/ZEN/AGA CAG TCA TAC AAA GAG AAT-IABkFQ

1.9 临床分离株的检测 采用胶乳凝集实验,对 1.4 步骤中测序为 GBS 的临床标本进行血清学分型。之后用 1.6 步骤中的方法对所有临床菌株进行 PCR 扩增。

1.10 统计学处理 采用 SPSS20.0 统计软件进行数据处理及统计分析,乳胶凝集试验与 TaqMan 荧光探针技术分型结果的比较采用 χ^2 检验,以 $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 临床菌株鉴定结果 29 株临床菌株经 Phoenix™-100 全自动细菌鉴定和 MALDI Biotyper 质谱鉴定均为 GBS,测序后 28 株为 GBS,另 1 株为化脓链球菌。

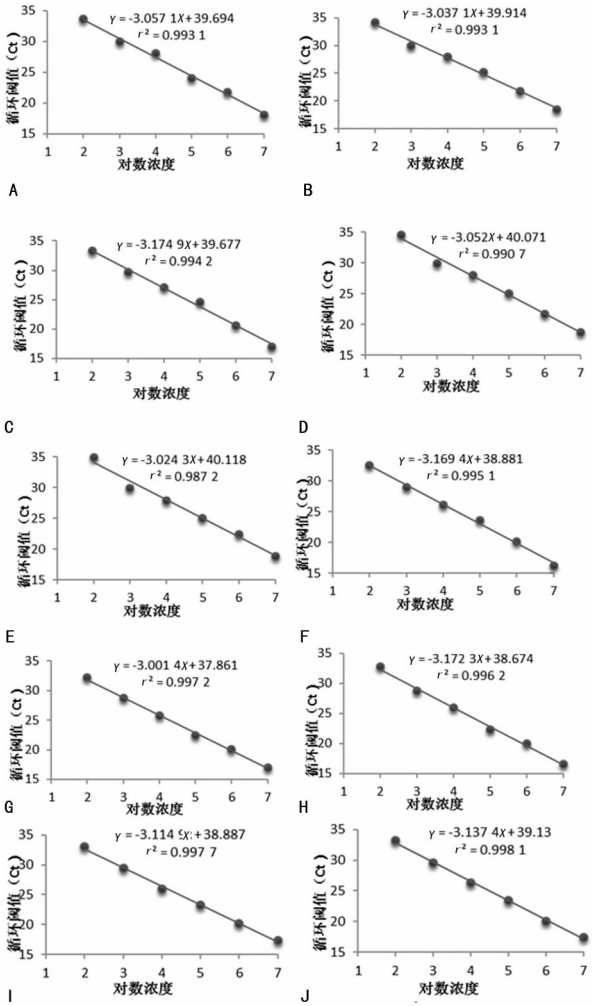
2.2 标准菌株 PCR 扩增结果 10 株不同血清型标准菌株,荧光定量 PCR 扩增的 Ct 值见表 3。10 株不同血清型标准菌株的 3 个重复的标准差均小于 0.5, Ct 值均小于 30,即结果均为阳性,TaqMan 荧光探针技术检测结果与标准菌株实际血清型一致。

表 3 标准菌株 PCR 扩增结果($\bar{x}\pm s$)

血清型	Ct	血清型	Ct
I a	17.98±0.13	V	16.10±0.44
I b	18.59±0.33	VI	17.07±0.28
II	17.22±0.09	VII	16.71±0.33
III	18.88±0.15	VIII	17.30±0.43
IV	18.93±0.38	IX	17.59±0.10

注:Ct 值取 3 组重复实验的平均值

2.3 灵敏度 PCR 扩增结果 10 株标准菌株经过一系列稀释后,对数浓度与 Ct 值呈线性关系,且 $r^2>0.98$,斜率 K 均为 $-3.5\sim-3.0$,所有标准曲线均显示出良好的线性关系。此外,以 $Ct<30$ 作为阳性判断标准,用 TaqMan 荧光探针技术检测不同血清型 GBS 的下限为 1 pg。标准曲线见图 1。



注:a~j 依次为 Ia、Ib、II~IX 型标准菌株,对数浓度 2 换算成代表 DNA 浓度为 100 fg,依次类推

图 1 标准菌株对数浓度与 Ct 线性曲线

2.4 特异性检测扩增结果 1 种血清型探针只能检测 1 种血清型的 GBS,而对于其他的血清型的 GBS,扩增反应均为阴性。

2.5 临床分离株的检测 28 株被测序鉴定为 GBS,其中乳胶凝集试验能够准确分型的有 23 株,这 23 株 TaqMan 荧光探针技术分型结果完全一致。剩下的 5

株 TaqMan 荧光探针技术也能够分型。具体分型结果见表 4。

表 4 28 株临床菌株胶乳凝集试验和 TaqMan 荧光探针分型结果

编号	TaqMan 荧光探针	胶乳凝集试验
104178	I a	I a
104212	I a	I a
105062	I a	I a
105189	I a	—
106007	I a	I a
106032	I a	I a
104982	I b	I b
105324	I b	I b
105468	I b	—
105149	II	II
105121	II	II
106123	II	II
104298	III	III
104519	III	III
105243	III	III
105381	III	—
106151	III	III
105113	IV	IV
105169	IV	IV
106217	V	V
106352	V	V
104726	VI	VI
105397	VII	VII
106214	VIII	—
106487	VIII	VIII
106531	VIII	VIII
104294	IX	IX
105893	IX	—

注:标本编号为本实验室的编号,一代表未能够分型的结果

3 讨 论

GBS 是引起孕妇围产期感染和导致新生儿败血症的主要原因^[1],早期筛查并在分娩期预防性地使用抗菌药物是目前预防新生儿感染的最主要方法^[10]。预防性地使用抗菌药物,可能会增加耐药菌产生的风险^[11]。因此,通过其他防御措施来预防围产期 GBS 感染势在必行。作为 GBS 重要致病因子之一的 CPS,可诱导机体产生中和抗体,目前相关疫苗的研究正在进行临床试验^[12]。GBS 的血清型由 CPS 的基因决定^[5],了解 GBS 血清型分布,对于制定合理的疫苗政策至关重要^[13]。此外,血清学分型在 GBS 致病性、流行病学研究方面也具有重要意义。

传统的血清学分型主要依靠免疫学方法,但该方法可能无法对 CPS 缺乏或低表达的菌株进行分型^[14]。本研究中,用胶乳凝集试验对 28 株 GBS 临床菌株分型,其中有 5 株无法被分型,这可能正是由于上述原因所致,但具体原因尚需进一步研究。目前分子分型方法多涉及两种不同的技术,操作复杂且技术要求较高。TaqMan 荧光探针技术具有简单、快速、高效扩增、高特异度和高灵敏度等特点,而且还可以实现定量分析^[15]。该技术实行完全闭管式操作,既避免了开盖引起产物污染问题,减少假阳性,还能避免环境污染^[9]。

本研究应用 TaqMan 荧光探针对 10 种不同血清型的 GBS 标准菌株进行检测的结果显示,不同血清型的 Ct 值均小于 30,结果均为阳性,该技术检测结果与胶乳凝集试验完全一致,且 3 个重复的标准差均小于 0.5,这说明本研究中建立 TaqMan 荧光探针对 GBS 的分型方法切实可靠。10 株不同血清型标准菌株经过一系列 10 倍稀释后,其对数浓度与 Ct 值呈现线性关系, r^2 均大于 0.98,斜率 K 为 $-3.0\sim 3.5$,所有标准曲线均显示出良好的线性关系。从标准曲线可以看出,若以 $Ct < 30$ 作为阳性判断标准,用 TaqMan 荧光探针技术检测不同血清型 GBS 的下限在 1 pg 左右,这完全可以满足临床标本检测及流行病学研究的需求。特异度检测结果表明,1 种血清型的探针只能检测对应血清型的 GBS,不同血清型之间互不干扰。对临床分离株的检测结果表明,当 GBS 存在 CPS 缺失或者低表达等情况时,TaqMan 荧光探针分型方法优于作为传统“金标准”的胶乳凝集试验。

综上所述,本研究建立的 TaqMan 荧光探针技术在检测不同血清型的 GBS 中,具有高特异度和高灵敏度的特点。本研究中,对临床标本的检测,仍然是建立在分离培养的基础上,未对临床标本直接检测进行研究,运用 TaqMan 荧光探针技术对不同来源的临床标本进行直接检测,可能灵敏度、特异度有所差异。若要实现使用 TaqMan 荧光探针技术对临床标本直接检测,还需要设计保守序列的荧光探针对 GBS 进行鉴定,同时与分型针结合,采用多重荧光探针技术,才能实现单管不开盖,一次完成对 10 种 GBS 血清型的检测。

参考文献

[1] 姚冬梅. 孕妇感染 B 群链球菌耐药性分析及其新生儿感染情况研究[J]. 国际检验医学杂志, 2015, 36(19): 2879-2880.

[2] REINHEIMER C, KEMPF V A, WITTEKINDR B E, et al. Group B streptococcus infections in neonates admitted to a German NICU: Emphasis on screening and adherence to pre-analytical recommendations[J]. Early Hum Dev, 2016, 103: 37-41.

[3] HAMED I A, AKHLAGHI F, SEYEDI S J, et al. Evaluation of group B Streptococci colonization rate in pregnant women and their newborn[J]. Acta Med Iran, 2012, 50 (12):805-808.

[4] BERTI F, CAMPISI E, TONIOLO C, et al. Structure of the type IX group B Streptococcus capsular polysaccharide and its evolutionary relationship with types V and VII[J]. J Biol Chem, 2014, 289(34):23437-23448.

[5] MADHI S A, CUTLAND C L, JOSE L, et al. Safety and immunogenicity of an investigational maternal trivalent group B streptococcus vaccine in healthy women and their infants; a randomised phase 1b/2 trial[J]. Lancet Infect Dis, 2016, 16(8):923-934.

[6] PARK C J, VANDEL N M, RUPRAI D K, et al. Detection of group B streptococcal colonization in pregnant women using direct latex agglutination testing of selective broth[J]. J Clin Microbiol, 2001, 39(1):408-409.

[7] 王丽, 叶巍, 马杰. 实时荧光 PCR 技术和细菌培养法检测妊娠晚期孕妇定植 B 群链球菌临床分析[J]. 国际检验医学杂志, 2014, 35(16):2220-2221.

[8] ELAILA NA, TENCY I, CLAEYS G, et al. Comparison of culture with two different Qpcr assays for detection of rectovaginal carriage of Streptococcus agalactiae (group B streptococci) in pregnant women[J]. Res Microbiol, 2011, 162(5):499-505.

[9] WOLF J, HAAS B, HOOF R, et al. Development and evaluation of Taqman assays for the differentiation of Dickeya (sub) species[J]. Eur J Plant Pathol, 2014, 138 (4):695-709.

[10] SCHRAG S J, ZYWICKI S, FARLEY M, et al. Group B streptococcal disease in the era of intrapartum antibiotic prophylaxis[J]. N Engl J Med, 2000, 342(1):15-20.

[11] VERANI J R, SPINA N L, LYNFIELD R, et al. Early-onset group B streptococcal disease in the United States: potential for further reduction[J]. Obstet Gynecol, 2014, 123(4):828-837.

[12] Barton M, Hawkes M, Moore D, et al. Guidelines for the prevention and management of community-associated methicillin-resistant Staphylococcus aureus: a perspective for Canadian health care practitioners[J]. Vaccine, 2012, 30 (28):4123.

[13] BELLAIS S, SIX A, FOUET A, et al. Capsular switching in group B Streptococcus CC17 hypervirulent clone; a future challenge for polysaccharide vaccine development[J]. J Infect Dis, 2012, 206(11):1745-1752.

[14] YAO K, POULSEN K, MAIONE D, et al. Capsular gene typing of Streptococcus agalactiae compared to serotyping by latex agglutination[J]. J Clin Microbiol, 2013, 51(2):503-507.

[15] MCAVIN J C, REILLY P A, ROUDABUSH R M, et al. Sensitive and specific method for rapid identification of Streptococcus pneumoniae using real-time fluorescence PCR[J]. J Clin Microbiol, 2001, 39(10):3446-3451.

(收稿日期:2017-07-20 修回日期:2017-09-26)

(上接第 437 页)
展的具体作用机制,有待进一步深入研究。

参考文献

[1] 中华人民共和国卫生和计划生育委员会医政医管局. 结直肠癌诊疗规范(2015 年版)[J]. 中华外科杂志, 2015, 53 (12):1177-1191.

[2] 李道娟, 李倩, 贺宇彤. 结直肠癌流行病学趋势[J]. 肿瘤防治研究, 2015, 42(3):305-310.

[3] ZIPPI M, MATTEI E, COCCO A, et al. Characteristics of colon polyps among asymptomatic patients undergoing first time colorectal cancer screening colonoscopy[J]. Italian J Med, 2015, 9(Suppl 2):S122-125.

[4] 沈胤晨, 石远凯, 韩晓红. 结直肠癌靶向治疗研究进展[J]. 中华病理学杂志, 2015, 44(6):430-433.

[5] 郭金萍, 朱琳, 苏银霞, 等. 结直肠癌危险因素及临床流行病学特征研究[J]. 实用癌症杂志, 2015, 30(4):544-546.

[6] 魏会平, 宋小青, 常月锋. 家族性结肠息肉并结肠癌一家系[J]. 中华医学遗传学杂志, 2014, 31(5):29-32.

[7] 李晓晴, 李袁飞. 结肠癌上皮间质转化信号通路机制研究[J]. 国际肿瘤学杂志, 2016, 43(5):19-21.

[8] 李晓晴. 上皮间质转化相关标志物在结肠癌及结肠癌肝转移组织表达差异研究[D]. 太原:山西医科大学, 2016.

[9] 胡彦建, 韩明子, 胡彦华. 上皮间质转化在原发性肝癌侵袭, 转移中的作用[J]. 胃肠病学和肝病学杂志, 2014, 23 (1):117-120.

[10] 尤伟强, 盛能全, 王志刚. 上皮间质转化在结直肠癌侵袭转移中的作用机制[J]. 国际外科学杂志, 2016, 43(5):349-352.

[11] 朱蕾, 隋华, 邓皖利. 信号通路调控上皮间质转化参与肿瘤侵袭转移的分子机制[J]. 国际肿瘤学杂志, 2014, 41 (3):172-177.

[12] VAN MARCK V, STOVE C, JACOBS K, et al. P-ca in adhesion and invasion: opposite roles in colon and bladder carcinoma[J]. Inter J Cancer, 2011, 128(5):1031-1044.

[13] 甘亚平. 胃贲门腺癌 P-ca 表达与临床特征的相关性研究[J]. 湖北科技学报(医学版), 2016, 30(3):194-196.

[14] 岳峰, 单铁英, 袁征, 等. Id-2 和 E-ca 在直肠癌组织中的表达及其临床意义[J]. 医学临床研究, 2015, 32(1):83-86.

[15] 陈顺华, 尹玉, 曹立宇, 等. YAP1 和 β -ca 在大肠癌中的表达及相关性研究[J]. 安徽医科大学学报, 2016, 51(6):836-840.

(收稿日期:2017-08-17 修回日期:2017-10-23)