

X-连锁严重联合免疫缺陷病的植入前遗传学诊断

吴海涛^{1,2}, 沈晓婷¹, 叶青剑³, 刘瑜亮¹, 钟依平¹, 曾艳红¹, 徐艳文¹, 周灿权¹

(1. 中山大学附属第一医院生殖医学中心, 广东 广州 510080; 2. 江门市中心医院生殖中心, 广东 江门 529030;

3. 中山大学附属第三医院妇科, 广东 广州 510630)

摘要:【目的】采用多重置换扩增建立一种可靠、准确的植入前遗传学诊断方法,应用于X-连锁严重联合免疫缺陷病(X-SCID)的植入前遗传学诊断(PGD)。【方法】选择5个位于致病基因IL-2受体 γ 链(IL2RG)基因两侧的短串联重复序列(STR)位点对X-SCID家系进行单体型分析,采用多重置换扩增(MDA)对单细胞进行全基因组扩增,对扩增产物采用在家系分析中具有多态性的STR位点进行单体型分析,结合位点Amel进行性别诊断,STR位点均采用单重荧光PCR,同时对IL2RG基因exon5进行测序分析。【结果】对家系分析中,共有3个STR位点具有多态性。对10个单淋巴细胞及10个单卵裂球进行了预实验;MDA扩增成功率为100%,对致病基因IL2RG exon5的行基因测序的检测效率为100%;对于3个有多态性的STR位点和AMEL,PCR扩增效率为96.3%(77/80),等位基因脱扣率(ADO)为11.5%(7/61)。对该家系进行了一个周期的PGD,对7个胚胎进行了诊断,其中2个为正常胚胎,移植后获得双胎妊娠,早产活产一个健康男婴及一个健康女婴。【结论】采用多重置换扩增结合致病基因特异性扩增测序检测及单体型分析在单细胞水平对X-连锁严重联合免疫缺陷病进行检测,两者相结合可避免污染、等位基因脱扣等导致的误诊,提高了PGD诊断效率。

关键词: X-连锁严重联合免疫缺陷病;植入前遗传学诊断;多重置换扩增;短串联重复序列;单体型分析

中图分类号: R715 **文献标志码:** A **文章编号:** 1672-3554(2017)06-0955-06

Preimplantation Genetic Diagnosis of X-linked Severe Combined Immunodeficiency

WU Hai-tao^{1,2}, SHEN Xiao-ting¹, YE Qing-jian³, LIU Yu-liang, ZHONG Yi-ping¹, ZENG Yan-hong¹,
XU Yan-wen¹, ZHOU Can-quan¹

(1.Reproductive Medicine Center, First Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, China; 2.Reproductive Medicine Center, Jiangmen Central Hospital, Jiangmen 529030, China; 3.Department of Gynecology, Third Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University, Guangzhou 510630, China)

Corresponding to: ZHOU Can-quan, E-mail:zhoucanquan@hotmail.com

Abstract: 【Objective】 To establish a reliable and accurate preimplantation genetic diagnosis (PGD) method using multiple displacement amplification (MDA), which can be applied to the diagnosis of X-linked severe combined immunodeficiency disease (X-SCID). 【Methods】 Haplotype analysis for the X-SCID family was performed using five short tandem repeats (STR) markers flanking the both sides of the interleukin-2 (IL-2) receptor gamma chain (IL2RG) gene. MDA technique was used for single-cell whole genomic amplification. The products were used as template in polymerase chain reaction (PCR) of informative STR markers found by linkage analysis for haplotype analysis as well as sequencing of the IL2RG gene exon 5. The amelogenin (AMEL) locus was used to do sex diagnosis. 【Results】 Linked analysis revealed 3 STR markers were informative. The method was evaluated with 10 single lymphocytes and 10 single blastomeres. MDA was successful in all single cell. The detection efficiency of gene sequencing of pathogenic IL2RG exon5 was 100%. The PCR efficiency of 3 STR informative markers and AMEL was 96.3%(77/80) and the average allele drop-out (ADO) rate was 11.5% (7/61). A cycle of PGD was performed on the family, and seven embryos were diagnosed, two of which were normal embryos. Twin pregnancy occurred after transplantation which were given a healthy baby boy and a healthy baby girl. 【Conclusion】 In this study, multiple displacement amplification combined with specific amplification/sequencing of pathogenic gene and haplotype analysis

收稿日期: 2017-06-19

基金项目: 广东省自然科学基金博士启动基金(S2013040014613), 广州市科技计划项目(201300000097)

作者简介: 吴海涛, 博士, 住院医师, 研究领域: 植入前遗传学诊断; 沈晓婷, 博士, 主治医师, 研究领域: 植入前遗传学诊断, 共同第一作者; 周灿权, 通信作者, E-mail: zhoucanquan@hotmail.com

in the single cell level of X-linked severe combined immunodeficiency disease were performed. The protocol can avoid misdiagnosis caused by contamination and ADO, and improve the diagnostic efficiency of PGD.

Key words: X-linked severe combined immunodeficiency; preimplantation genetic diagnosis (PGD); multiple displacement amplification (MDA); short tandem repeat (STR); haplotype analysis

[J SUN Yat-sen Univ (Med Sci), 2017, 38(6): 956-960]

严重联合免疫缺陷病 (severe combined immunodeficiency, SCID) 为一组由不同基因异常所致严重 T 细胞缺乏 (或功能异常), 并伴随 B 细胞功能异常的原发性免疫缺陷疾病 (primary immunodeficiency, PID), 发病率为 $1/(7.5\sim 10)$ 万^[1-2]。SCID 的遗传方式有 X-连锁隐性和常染色体隐性遗传两种, 其中 X-连锁严重联合免疫缺陷病 (X-linked-severe combined immunodeficiency, X-SCID) 最常见, 占 SCID 病例的 50%~60%^[3], 其致病基因为白细胞介素 2 受体基因 (IL2RG), 定位于 X q13.1, 有 8 个外显子。因 IL2RG 缺陷导致 T 细胞发育过程中细胞内信号转导障碍, 引起严重的 T 细胞缺陷。X-SCID 治疗效果欠佳, 对有家族史或者携带者夫妇行产前诊断可避免患儿的出生^[4]。植入前遗传学诊断 (preimplantation genetic diagnosis, PGD) 可以在胚胎移植前进行诊断, 选择正常或遗传表型正常的胚胎进行移植, 可避免传统孕中期产前诊断因胎儿异常导致的引产, 具有重要的优生意义。本文阐述了采用单细胞多重置换扩增结合单体型分析及致病基因测序建立的 X-SCID 的 PGD 方法, 并成功进行了临床应用, 诞生了一对健康的男、女性婴儿。

1 材料与方 法

1.1 研究对象

女方 34 岁, 男方 38 岁, G4P1A3, 曾生育一个 X-连锁严重联合免疫缺陷病患儿, 该患儿于 3 月大时出现发反复发热后基因诊断为 IL2RG exon 5, 736G>T, 患儿于 11 月大时夭折。女方为 X-连锁严重联合免疫缺陷病携带者, 男方 IL2RG 基因检测未见异常, 后于早孕期行 3 次人工流产 (家系图详见图 1)。该项目经中山大学附属第一医院伦理委员会批准。患者已签署知情同意书。

1.2 单细胞预实验

采用女方外周血分离的 10 个单淋巴细胞及 10 个单卵裂球 (废弃胚胎标准: 于本生殖医学中

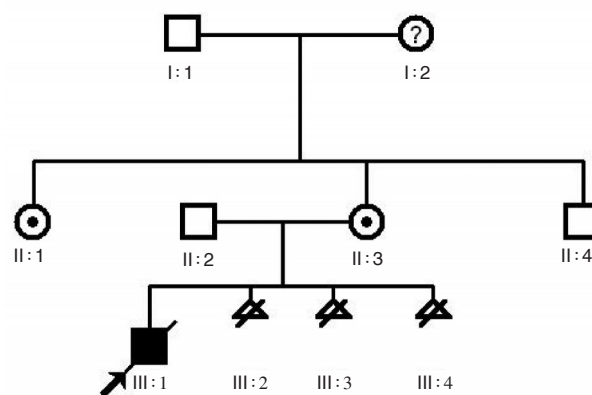


图 1 X-SCID 家系系谱图

Fig.1 Pedigree analysis for the X-SCID family

心行 IVF-ET 或 ICSI-ET, 取卵后第 3 天因细胞数少于 4 个, 或细胞数正常但碎片 >35% 不适合移植或冻存且均为正常受精) 进行预实验^[5-6]。所有分析的单细胞采用 MDA 扩增试剂 (Repli-g kit 试剂盒 Qiagen, Germany) 进行 MDA, 步骤同前研究^[7]。

1.3 基因突变检测和单体型分析

提取夫妇双方外周血基因组 DNA, 由于先证者已去世, 采用其生前基因检测时保存的 DNA 标本进行家系分析。本研究共选用 6 个基因位点进行评估, 包括致病基因 IL2RG exon 5、AMEL 及 5 个位于 IL2RG 基因上下游 2Mb 以内的 STR 位点 (DXS339、DXS106、DXS453、DXS227、DXS991)^[8-10] (表 1)。对家系成员的基因组 DNA 进行单体型分析, 选择有多态性的 STR 位点, 对单细胞的 MDA 产物只进行有多态性的 STR 位点、AMEL 和 IL2RG exon 5 测序检测。

1.3.1 荧光 PCR 检测 STR 位点及 IL2RG exon 5 测序的引物序列均参考相关文献^[8-10] 合成 (表 1), STR 位点正向引物 5' 端采用荧光素 6-FAM 标记。

1.3.2 PCR 反应体系及反应条件 PCR 反应体系: 25 μ L, 含 2.5 μ L 10 \times PCR buffer, 2 mmol/L 的 $MgCl_2$, 0.2 mmol/L dNTP, 正反向引物各 0.2 μ mol/L, 3 μ L 的 1/100 稀释的 MDA 产物或外周血 DNA, 1 U

表1 引物序列

Table 1 Primer sequences used for analysis

Locus	Forward(5'-3')	Backward(5'-3')
DXS339	FAM-ATGAAATAGCCAGTACTCC	TCTGCTATAACCCACACCATC
DXS106	FAM-CCTGTACTCCTAGGTATTTGT	AGAGAGCCAAATCAAGAATGC
DXS453	FAM-GCCCTACCTTGGCTAGTTA	AACCTCAGCTTATACCCAAAG
DXS227	FAM-GTCAGAATAGAAGGCTCCACC	CCTACCTCCTCAGTGCCTCTT
DXS991	FAM-TAGCTAAAAATGTATGAGTA	AATAGTGTTCCTAAGGG
AMEL	FAM-CCCTGGGCTCTGTAAAGAATAGTG	ATCAGAGCTTAAACTGGGAAGCTG
IL2RG exon 5	AGTAGCACAGATGACACTGGTGG	TAGAAAGGCTGGGGTGTGG

的 *Taq* 酶。PCR 反应条件: 95 °C 5 min 预变性, 95 °C 30 s 变性、58 °C 1 min 退火、72 °C 1 min 延伸, 共 35 个循环, 72 °C 7 min。

1.3.3 ABI 3100 基因分析仪分析 STR 扩增产物及限制性内切酶酶切后的产物在 ABI 3100 基因分析仪上进行毛细管电泳。

1.3.4 基因测序 采用 PCR 扩增后产物送英俊公司进行基因测序。

1.4 植入前遗传学诊断

促排卵采用长效长方案, 达菲林 0.8 mg 垂体降调节, 于降调节后 16 d (来月经第 4 天) 采用果纳芬 225 U 启动, 后加针到 300 U, 共用 13 d, 当有两个主导卵泡直径 ≥ 18 mm 时采用艾泽 250 μ g 扳机, 36 h 后 B 超介导下经阴道取卵。取卵后 4~6 h 行卵胞浆内单精子注射 (intracytoplasmic sperm injection, ICSI), 授精后 16~18 h 观察受精情况, 如可见两个原核和两个极体视为正常受精。胚胎用 HTF 培养液培养, 于取卵后第 5 天和第 5 天早上观察胚胎, 对所有囊胚进行滋养层细胞活检, 每个囊胚活检 5~10 个细胞, 活检方法同既往研究^[11], 活检后的囊胚单独进行玻璃化冷冻。选择 PGD 结果正常的胚胎于冻融胚胎周期进行移植。于胚胎移植后 14 d 查血 HCG 确定是否妊娠, 于胚胎移植后 3 周行经阴道 B 超确定是否临床妊娠, 于孕中期行产前诊断验证 PGD 结果。

2 结果

2.1 家系单体型分析

采用 5 个 STR 位点对先症者、夫妇双方 DNA 进行检测, 共有 3 个位点具有多态性, 分别为:

DXS106、DXS453、DXS991, 通过先证者的单体型分析结果可以区分出母亲两条 X 染色体分别为异常的单体型和正常单体型 (图 2)。

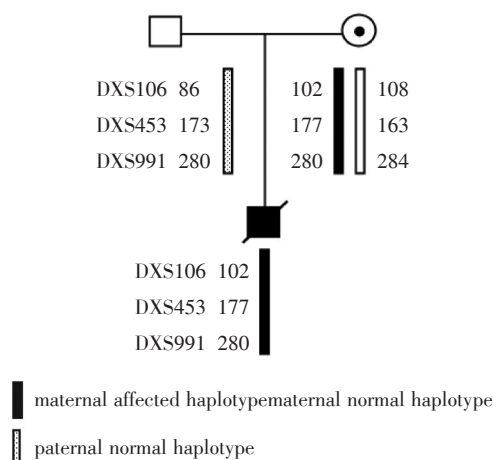


图2 X-连锁严重联合免疫缺陷病家系单体型分析
Fig.2 Haplotype analysis for the X-SCID family

2.2 IL2RG exon 5 基因测序结果

特异性扩增 IL2RG exon 5, 在单细胞 MDA 产物中也能准确进行测序分析, 父亲 (正常) 显示 e.736 位点为单一的 G 峰 (c.736G), 提示其基因型为纯合野生型; 母亲 (携带者) 显示为 G/T 杂合双峰 (c.736G 和 T), 提示其基因型为杂合型 (测序结果见图 3); 先证者 (患者) 显示为单一的 T 峰 (c.736T), 提示其基因型为纯合突变型。

2.3 预实验结果

将母亲来源的 10 个单个淋巴细胞及 3 个废胚来源的 10 个单个卵裂球进行 MDA 扩增, MDA 扩增

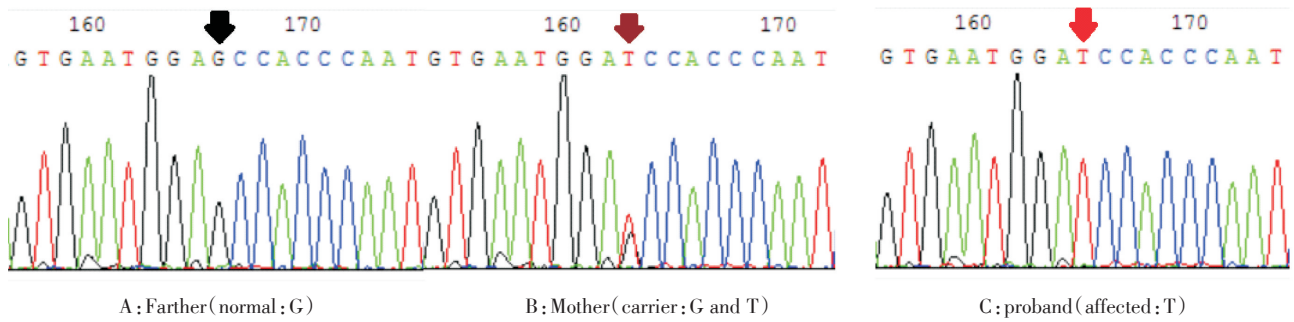


图3 IL2RG exon 5 测序图

Fig.3 Sequencing picture of IL2RG exon 5

效率为100%(20/20)。对于致病基因IL2RG exon5的测序检测效率为100%，所有单淋巴细胞中均检测出G和T的杂合信号，未出现等位基因脱扣(ADO)，10个单卵裂球诊断结果均为G；对于可用的4个STR，PCR扩增效率为96.3%(77/80)，等位基因脱扣率为11.5%(7/61)。所有空白对照未检测出阳性结果。

2.4 植入前遗传学诊断结果

共获卵10个，均为M II，正常受精10个，形成4个Day5囊胚及3个6d囊胚，共7个胚胎进行活检，均MDA成功，PCR扩增效率100%(35/35)，总ADO率为15.8%(3/19)，通过单体型分析结果验证IL2RG exon 5测序均未出现ADO，DXS453位点出现2次ADO，DXS991位点出现1次ADO。PGD结果显示4个携带者胚胎、2个正常胚胎及一个异常胚胎(表2)。2个正常胚胎于冻融周期移植后获得双胎妊娠，于孕18周行羊水产前诊断，结果与PGD结果相符，于孕34周剖宫产下健康双胎，男

婴体质量为2.8 kg，女婴2.15 kg，于出生一个月后行IL2RG基因诊断均未见异常，与PGD结果及产前诊断结果相符。

3 讨论

X-连锁严重联合免疫缺陷病的致病基因IL2RG定位于X染色体q13.1，含有8个外显子，全长4145个碱基对。目前国际上已经报道了264种IL2RG突变引起的SCID^[13-14]。本例患儿的IL2RG突变位于第5个外显子处，736位碱基G突变为T，此种突变类型国内已有报道^[15]。该病例女方被证实为携带者，男方为正常，女方的姐姐也是携带者。

由于X-SCID是X-连锁隐性遗传性疾病，若女方为携带者，其生育的女性子代中一半为携带者一半为正常，生育的男性子代中一半为患者一半为正常。既往采用性别诊断行PGD，往往选择

表2 临床植入前遗传学诊断结果

Table 2 Clinical PGD results

Site	E1	E2	E3	E4	E5	E6	E7
DSX106	86 102	108	102	86 102	86 102	86 108	86 102
DSX453	173 177	163	177	173 177	ADO 177	173 ADO	173 177
DSX991	280 280	284	280	280 280	280 280	ADO 284	280 280
AMEI	102	102 108	102 108	102	102 108	102	102 108
IL2RG	G/T	G	T	G/T	G/T	G	G/T
Diagnosis carrier	carrier	normal	affected	carrier	carrier	normal	carrier
Outcome		ET					ET

ET: embryo transfer

女胚进行移植,导致一半的正常男胚丢失,生育的女婴也面临将来的生育风险。建立一种可以对X-SCID致病基因进行检测的PGD方法对X-连锁严重联合免疫缺陷病携带者家系具有重要的意义。在单细胞水平,由于可以检测的DNA物质极少,仅6~8 pg,既往采用巢式PCR等方法进行PGD体系的建立往往需要对PCR的反应条件及反应体系进行反复优化,难度大耗费时间长。采用全基因组扩增(whole genome amplification, WGA)作为种植前遗传学诊断的第一步,增加起始模板量,再进行多个基因位点检测,可以大大增加单细胞分析的准确性和可靠性^[5],而且MDA可以直接采用外周血DNA扩增的条件及体系进行PCR,大大减少建立新体系所需要的时间,本病种我们仅采用2个月的时间即已建立了该PGD体系。在多态性座位中,STR位点的等位基因数目较多,已被广泛应用于PGD中。但是STR位点与致病基因之间仍有一定的距离,减数分裂过程中可能发生染色体交换和基因重组,破坏这种连锁关系,因此为减少因为基因重组所引发的误诊,在单体型分析时应尽可能纳入更多紧密连锁的STR位点,而且致病基因两端都必须要有有多态性的位点,本研究采用了5个STR位点进行检测,最后有3个具有多态性(一个位于3'端,2个位于5'端),可用于单体型分析。由于单细胞DNA产物量极少,采用全基因组扩增容易出现优势扩增或者等位基因脱扣(ADO)。既往的研究报道,单细胞MDA产物的ADO率为0~60%^[16]。我们既往的研究对单细胞MDA体系进行了优化,该诊断系统已经成熟应用于多个病种中^[11]。在既往的研究中,对单细胞MDA过程中的操作细节进行了严格控制,ADO率为8.5%^[17]。在本病种的预实验中致病基因的测序结果良好,未发生扩增失败或者等位基因脱扣现象;对于4个STR位点,PCR扩增效率为96.3%(77/80),等位基因脱扣率(ADO)为11.5%(7/61)。本研究在预实验中采用单细胞进行诊断效率的验证,随着我们中心活检技术的更新,我们逐渐在临床应用中采用囊胚期滋养层细胞活检替代卵裂胚期单卵裂球活检,囊胚活检可活检的细胞更多,为5~10个,降低了单细胞在胚胎转移中丢失的发生率,也提高了MDA的扩增效率。向患者交代PGD过程中可能出现基因重组或ADO等导致误诊的风险后,进一步进行了临床应用。在

临床PGD中,7个胚胎MDA成功率为100%,整体PCR扩增效率100%,ADO率为15.8%(3/19),7个胚胎的基因测序结果与单体型分析结果相符。3次ADO中两次ADO出现在6号胚胎,6号胚胎基因测序结果为正常胚胎,DXS991位点出现284 bp片段,DXS106位点出现86和108 bp两个片段,说明该胚胎获得了母源的正常单体型,因此为正常胚胎。由于MDA结合单体型分析及基因测序检测,无法于24 h内出结果,因此对所有囊胚进行了冷冻,在后续冻融胚胎周期进行移植,该家系在移植两个冻融囊胚后获得双胎妊娠,于孕18周行产前诊断,结果与PGD结果相符,后剖腹产双活胎,行IL2RG基因诊断均未见异常,现均体健。

总之,采用MDA结合单体型分析及致病基因测序检测进行X-连锁严重联合免疫缺陷病的PGD,提高了基因诊断的准确性,降低了误诊率,为具有X-连锁严重联合免疫缺陷病遗传风险的家系提供一种有效的优生选择。

参考文献

- [1] Buckley RH, Schiff RI, Schiff SE, et al. Human severe combined immunodeficiency: Genetic, phenotypic, and functional diversity in one hundred eight infants [J]. *J Pediatr*, 1997, 130(3): 378-387.
- [2] Primary immunodeficiency diseases: Report of a WHO scientific group [J]. *Immunodef Rev*, 1992, 3(3): 195-236.
- [3] Noguchi M, Yi H, Rosenblatt HM, et al. Interleukin-2 receptor gamma chain mutation results in X-linked severe combined immunodeficiency in humans [J]. *J Immunol*, 2008, 181(9): 5817-5827.
- [4] 吴庆华,史惠蓉,刘宁,等. X-连锁严重联合免疫缺陷病一家系突变分析及产前诊断研究 [J]. *中华儿科杂志*, 2012, 50(11): 851-854.
Wu QH, Shi HR, Liu N, et al. Mutation analysis and prenatal diagnosis of a Chinese family with X-linked severe combined immunodeficiency [J]. *Chin J Pediatr*, 2012, 50(11): 851-854.
- [5] 沈晓婷,郭奕斌,徐艳文,等. 采用多重置换扩增进行软骨发育不全的植入前遗传学诊断 [J]. *中山大学学报(医学科学版)*, 2015, 36(4): 564-568.
Shen XT, Guo YB, Xu YW, et al. Methodology of pre-implantation genetic diagnosis for achondroplasia by multiple displacement amplification [J]. *J Sun Yat-sen Univ (Med Sci)*, 2015, 36(4): 564-568.

- [6] 沈晓婷,吴海涛,徐艳文,等.短串联重复序列在染色体罗氏易位植入前遗传学诊断的应用[J].实用妇产科杂志,2016,32(11):830-833.
Shen XT, Wu HT, Xu YW, et al. Preimplantation genetic diagnosis of robertsonian translocation by short tandem repeat[J]. J Pract Obstet Gynecol, 2016, 32(11): 830-833.
- [7] Shen X, Xu Y, Zhong Y, et al. Preimplantation genetic diagnosis for alpha- and beta-double thalassemia[J]. J Assist Reprod Genet, 2011, 28(10): 957-964.
- [8] Takata RI, Speck Martins CE, Passosbueno MR, et al. A new locus for recessive distal spinal muscular atrophy at Xq13.1-q21[J]. J Med Genet, 2004, 41(3): 224-229.
- [9] Puck JM, Conley ME, Bailey LC. Refinement of linkage of human severe combined immunodeficiency (SCIDX1) to polymorphic markers in Xq13[J]. Am J Hum Genet, 1993, 53(1): 176-184.
- [10] Müller U, Haberhausen G, Wagner T, et al. DXS106 and DXS559 flank the X-linked dystonia-parkinsonism syndrome locus (DYT3)[J]. Genomics, 1994, 23(1): 114-117.
- [11] 沈晓婷,徐艳文,钟依平,等.多重置换扩增结合短串联重复序列在植入前遗传学诊断中的应用[J].北京大学学报(医学版),2013,45(6):852-858.
Shen XT, Xu YW, Zhong YP, et al. Combination of multiple displacement amplification with short tandem repeat polymorphism in preimplantation genetic diagnosis[J]. Beijing Daxue Xuebao (Health Sci), 2013, 45(6): 852-858.
- [12] Hu X, Wang J, Li Y, et al. Clinical considerations of preimplantation genetic diagnosis for monogenic diseases[J]. PLoS One, 2015, 10(9): e0139613.
- [13] Buckley RH, Schiff RI, Schiff SE, et al. Human severe combined immunodeficiency: Genetic, phenotypic, and functional diversity in one hundred eight infants[J]. J Pediatr, 1997, 130(3): 378-387.
- [14] Puck JM, Pepper AE, Henthorn PS, et al. Mutation analysis of IL2RG in human X-linked severe combined immunodeficiency[J]. Blood, 1997, 89(6): 1968-1977.
- [15] 陈香元,曾华松,韦茹,等.儿童原发免疫缺陷病110例临床特点及基因诊断[J].广东医学,2010,31(1):28-31.
Chen XY, Zeng HS, Wei R, et al. Clinical features and genetic analysis in 110 children with primary immunodeficiency[J]. Guangdong Med J, 2010, 31(1): 28-31.
- [16] Renwick PL, Trussler J, Lashwood A, et al. Preimplantation genetic haplotyping: 127 diagnostic cycles demonstrating a robust, efficient alternative to direct mutation testing on single cells[J]. Reprod Biomed Online, 2010, 20(4): 470-476.
- [17] 沈晓婷,张成,徐艳文,等.采用多重置换扩增进行脊肌萎缩症的植入前遗传学诊断方法学研究[J],中华优生与遗传杂志,2015,23(9):93-96.
Shen XT, Zhang C, Xu YW, et al. Methodology study of preimplantation genetic diagnosis for spinal muscular atrophy by multiple displacement amplification[J]. Chin J Birth Health Hered, 2015, 23(9): 93-96.

(编辑 徐杰)

(上接第942页 from page 942)

- aur.1819. [Epub ahead of print]
- [22] Premack D, Woodruff G. Does the chimpanzee have a theory of mind?[J]. Behav Brain Sci, 1978, 1(4): 515-526.
- [23] Davis MH, Hull JG, Young RD, et al. Emotional reactions to dramatic film stimuli: The influence of cognitive and emotional empathy[J]. J Pers Soc Psychol, 1987, 52(1): 126-133.
- [24] Schaller M, Cialdini RB. The economics of empathic helping: Support for a mood management motive[J]. J Exp Soc Psychol, 1988, 24(2): 163-181.
- [25] Blair RJ. Fine cuts of empathy and the amygdala: Dissociable deficits in psychopathy and autism[J]. Q J Exp Psychol (Hove), 2008, 61(1): 157-170.
- [26] Malti T, Gummerum M, Keller M, et al. Early sympathy and social acceptance predict the development of sharing in children[J]. PLoS One, 2012, 7(12): e52017.
- [27] 谷良峰.大学生共情水平与亲社会行为倾向的关系[J].沧州师范学院学报,2015,31(1):98-100.
Gu LF. Correlation between empathy and prosocial tendency in college students[J]. J Cangzhou Norm Univ, 2015, 31(1): 98-100.

(编辑 刘清海)