

不同方法检测 NMO-IgG/抗 AQP4 抗体滴度的比较

赖 蓉, 刘俊秀, 孙巧松, 黄 帆, 丰岩清*

(中山大学附属第一医院神经科, 广东 广州 510080)

摘 要:【目的】旨在比较鼠脑法和细胞法检测中国人视神经脊髓炎(NMO)疾病谱(NMOSD)的滴度是否具有一致性。【方法】每个样本分别采用鼠脑法和细胞法检测, 阳性血清采取倍比稀释以确定最终稀释倍数。应用盲法检测血清 NMO-IgG/抗水通道蛋白 4(AQP4)110 例, 其中视神经脊髓炎 19 例, 复发性视神经炎(RON)17 例, 纵形扩展性脊髓炎(LETM)13 例, 多发性硬化(MS)31 例, 健康对照(HC)30 例; 对其检测的阳性率和滴度进行分析, 并比较滴度与脊髓病变长度的相关性。【结果】大部分样本用两种方法检测的滴度之间都缺乏一致性。NMO 组患者 NMO-IgG/抗 AQP4 抗体鼠脑法 (63.2%, 12/19), 细胞法 (89.5%, 17/19), RON 组鼠脑法 (47.1%, 8/17), 细胞法 (70.6%, 12/17), LETM 组鼠脑法 (46.2%, 6/13), 细胞法 (69.2%, 9/13), MS 组鼠脑法 (6.5%, 2/31), 细胞法 (9.7%, 3/31)。鼠脑法和细胞法检测所得到的 NMOSD 患者 NMO-IgG/抗 AQP4 抗体滴度均和脊髓病变的长度无线性相关性, 两种检测方法之间也缺乏滴度线性相关性。【结论】鼠脑法和细胞法检测抗体滴度的不一致性提示有必要进行多因素相关性研究以探讨影响两种检测方法抗体滴度的因素。

关键词: 视神经脊髓炎; NMO-IgG; 抗水通道蛋白 4 抗体; 鼠脑法; 细胞法; 滴度

中图分类号: R744.52

文献标志码: A

文章编号: 1672-3554(2012)03-0407-05

Comparative Analysis of Methods for Titrating Anti-aquaporin-4 Antibodies in Neuromyelitis Optica Spectrum

LAI Rong, LIU Jun-xiu, SUN Qiao-song, HUANG Fan, FENG Yan-qing*

(Department of Neurology, The First Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, China)

Abstract: 【Objective】 This study was aimed to investigate the titer consistency in parallel between tissue-based IIFA and cell-based IIFA in Chinese patients with neuromyelitis optica (NMO) spectrum disorders. 【Methods】 Every sample was tested by the tissue-based IIFA and cell-based IIFA separately. Positive serum samples were titrated in doubling dilutions, to ascertain the maximum dilution that yielded positive results separately. We assessed the seroprevalence and the titer consistency of anti-aquaporin-4 antibodies of serum samples from patients with neuromyelitis optica (NMO, 19), recurrent optic neuritis (RON, 17), longitudinally extensive transverse myelitis (LETM, 13), multiple sclerosis (MS, 31), health control (HC, 30). Moreover, we analyzed the relation of anti-aquaporin-4 antibody titers and spinal cord lesions on MRI. 【Results】 We noticed lack of concordance in titer detection in most samples between the two techniques. We found 63.2% (12/19) of NMO patients were seropositive for AQP4 antibodies by tissue-based IIFA versus 89.5% (17/19) by cell-based IIFA. 47.1% (8/17) of RON patients were seropositive for AQP4 antibodies by tissue-based IIFA versus 70.6% (12/17) by cell-based IIFA. 46.2% (6/13) of LETM patients were seropositive for AQP4 antibodies by tissue-based IIFA versus 69.2% (9/13) by cell-based IIFA. 6.5% (2/31) of MS patients were seropositive for AQP4 antibodies by tissue-based IIFA versus 9.7% (3/31) by cell-based IIFA. The lengths of spinal cord lesions on MRI were not correlated with the titers of anti-AQP4 antibody in both assays. The two assays have no linear dependence in measuring this antibody titer. 【Conclusion】 The current discrepancy between the two assays implies the necessity to study the potential impact on titers in both assays.

Key words: neuromyelitis optica; NMO-IgG; anti-aquaporin-4 antibody; tissue-based indirect immunofluorescence assay; cell-based immunofluorescence assay; titer

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2012, 33(3):407-411]

收稿日期: 2012-02-21

基金项目: 广东省自然科学基金(31694; 2004B33801006)

作者简介: 赖 蓉, 硕士, 研究方向: 神经免疫学, E-mail: huiyuanpi@yeah.net; * 通信作者: 丰岩清, E-mail: fyqgz@sohu.com

2004年 Lennon 等^[1]利用鼠脑组织间接免疫荧光法(tissue-based indirect immunofluorescence assay, tissue-based IIFA)发现视神经脊髓炎(neuromyelitis optica, NMO)病人血清中存在能和小鼠小脑、中脑等脑组织特异性结合的抗体,将其命名为 NMO-IgG,认为该抗体对于区分 NMO 和多发性硬化(multiple sclerosis, MS)有重要意义。2005 年 Lennon 等用免疫双标法进一步证实该抗体的特异性抗原是水通道蛋白 4(aquaporin4, AQP4)^[2],将其称为抗 AQP4 抗体。目前该抗体的检测已经在临床上得到广泛的应用,并被纳入 NMO 新的诊断标准中。除了在 NMO 中存在 NMO-IgG/AQP4 抗体外,在 NMO 相关性疾病中如复发性视神经炎(recurrent optic neuritis, RON)、纵形扩展性脊髓炎(longitudinally extensive transverse myelitis, LETM)等也可有此抗体存在,并由此发展了视神经脊髓炎疾病谱(neuromyelitis optica spectrum disorders, NMOSD)的概念^[3]。近年来 NMO-IgG/Anti-AQP4 抗体的检测取得了很大进展。然而基于鼠脑的间接免疫荧光法(鼠脑法)及基于稳定表达 AQP4 细胞的间接免疫荧光法(cell-based indirect immunofluorescence assay, cell-based IIFA)仍然是最常用的两种方法,两种方法检测的一致性一直备受关注。抗 AQP4 抗体滴度被认为是和 NMOSD 临床表现、复发和预后均有重要相关性的指标^[4]。然而,分别应用鼠脑法和细胞法对同一标本抗体的滴度检测是否具有一致性?目前国际上仍然缺乏相应的研究。因而对细胞法和组织法两种检测体系所产生的滴度进行相关性的研究有重要的临床和科学意义。本研究的目的是在国人 NMOSD 中比较该抗体两种检测方法的滴度相关性和检测效率,及滴度与 NMO/LETM 累及脊髓节段的相关性。

1 材料与方 法

1.1 患者来源与取材

我们检测了 80 例临床确诊病人的血清,患者来自于 2009 年 1 月至 2011 年 10 月中山大学附属第一医院神经内科住院及门诊患者。其中 NMO 19 例, RON 17 例, LETM 13 例, MS 31 例,同时设健康对照(HC)30 例。所有入组者均向本人讲明了该实验的目的,取得本人同意后取静脉血,采血前

患者未经激素及免疫抑制剂等治疗。血清样本保存在-80℃冰箱。纳入标准:①NMO 符合 2006 年新修订的诊断标准(除外 NMO-IgG 阳性)^[5];②LETM 病人不符合 NMO 诊断标准,脊髓磁共振显示 T2 加权像至少有三个节段连续信号异常;③RON 患者单眼或双眼视力至少降到 0.1,持续 1 年;④MS 患者临床诊断符合 McDonald 标准^[6]。

1.2 主要材料与试剂

雌性 6~8 周的 C57BL/6 小鼠,体质量 18~20 g,由中山大学医学实验动物中心提供。手术切除的成人脑膜瘤患者的小脑组织由中山大学附属第一医院神经外科提供。PEGFP 质粒,HEK293 细胞为本实验室保存;总 RNA 提取试剂盒购自 Qiagen 公司;cDNA 合成试剂盒, *Pfu* DNA 聚合酶购自 Takara 公司;Lipo2000 购自 Invitrogen 公司;DMEM,胎牛血清,2.5 g/L 胰蛋白酶,Opti-MEM 培养液购自 Gibco 公司;G418,兔抗人 AQP4 多克隆抗体, FITC 标记羊抗人 IgG, Cy3 标记羊抗人 IgG, Cy3 标记羊抗兔 IgG 均购自 sigma 公司。

1.3 方 法

1.3.1 鼠脑间接免疫荧光法(tissue-based IIFA)检测 NMO-IgG 及其滴度 按 Lennon 等^[1]的方法,取切好的 C57BL/6 小鼠的脑片,0.01 mol/L PBS 洗涤后,山羊血清封闭 30 min,加入血清(1:20 稀释),4℃过夜。洗涤后加二抗 FITC 标记羊抗人 IgG(1:200 稀释),室温孵育 1 h。PBS 漂洗后加兔抗人 AQP4 多克隆抗体(1:100 稀释)室温 2 h,洗涤后再加 Cy3 标记羊抗兔 IgG(1:100 稀释)室温 1 h,洗涤后荧光显微镜观察。分别设立阳性对照和阴性对照。若出现如文献[1]一致的图片则判断为阳性。每份样本重复 3 次,阳性标本行抗体滴度检测,采用倍比稀释,设立的梯度分别为 1:80、1:160、1:640、1:1280。为消除非特异性染色,血清标本提前用小鼠肝粉(1:60)预处理。

1.3.2 细胞间接免疫荧光法(cell-based IIFA)检测抗 AQP4 抗体 按本研究小组已成功构建的基于 PEGFP-M23-AQP4 的检测方法^[7]。将质粒转染 HEK293 细胞后 G418 筛选稳定表达 AQP4 的细胞株。培养表达 AQP4 的 EGFP-M23-AQP4/HEK293 细胞和空转质粒细胞。0.1 g/L 多聚赖氨酸铺板。当细胞融合 70%~80%时用多聚甲醛溶液固定细胞 10 min, PBS 洗涤,山羊血清封闭 1 h;加入血清(1:60 稀释)室温孵育 2 h; PBS 漂洗后加二抗 Cy3

标记羊抗人 IgG(1:200 稀释),室温孵育 1 h, PBS 洗涤后荧光显微镜检, 分别设立阳性对照和阴性对照。每份样本重复 3 次,阳性标本行抗体滴度检测,设立的梯度分别为:1:240、1:960、1:3 840、1:7 680、1:15 360。

1.4 统计分析

采用 SPSS 18.0 统计学软件进行处理,不同组患者血清阳性率比较采用 Fisher 精确检验, 同组患者两种方法血清阳性率比较采用 McNemar 检验, 同组患者两种方法抗体滴度比较采用 Mann-Whitney 秩和检验,两种方法检测滴度相关性比较采用 Spearman 秩相关分析,累积脊髓节段和两种方法的滴度比较采用 Spearman 秩相关分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 鼠脑间接免疫荧光法 (tissue-based IIFA) 检测的血清阳性率和滴度

用 FITC 标记血清中 NMO-IgG,Cy3 标记微血管上的 AQP4。免疫双标证实 NMO-IgG 在中枢神经系统微血管上同 AQP4 分布一致,重合良好(图 1,封 2)。通过检测发现在 19 例 NMO 中 12 例阳性(63.2%),17 例 RON 中 8 例阳性(47.1%),13 例 LETM 中 6 例阳性(46.2%),31 例 MS 中 2 例阳性(6.5%),30 例健康对照中无一检测到 NMO-IgG。阳性血清滴度分布在 1:80-1:1 920 之间。

2.2 细胞间接免疫荧光法 (cell-based IIFA) 检测血清阳性率和滴度

通过稳转 AQP4 的 EGFP-AQP4/HEK293 细胞检测血清中的 AQP4-Ab。用 Cy3 标记人血清中的 AQP4 抗体。蓝光(波长为 420 ~ 490 nm)激发下 GFP 呈绿色, 且主要分布于细胞膜区域。当存在 AQP4 抗体时,绿光(波长为 535 ~ 550 nm)激发下 Cy3 标记二抗呈红色, 重合的图片显示 GFP 和 Cy3 分布一致,都位于细胞膜,呈黄色(图 2,见封 2)。通过检测发现 AQP4-Ab 在 19 例 NMO 中 17 例阳性 (89.5%),17 例 RON 中 12 例阳性

表 1 两种方法检测血清中的 NMO-IgG/Anti-AQP4 抗体阳性率

Table 1	Frequency of the NMO-IgG/Anti-AQP4 antibody in serum detected by two assays				n/N(%)
	NMO	RON	LETM	MS	HC
NMO-IgG(tissue-based IIFA)	12/19(63.2)	8/17(47.1)	6/13(46.2)	2/31(6.5)	0/30
Anti-AQP4 antibody(cell-based IIFA)	17/19(89.5)	12/17(70.6)	9/13(69.2)	3/31(9.7)	0/30

NMO: neuromyelitis optica; RON: recurrent optic neuritis; LETM: longitudinally extensive transverse myelitis; MS: multiple sclerosis; HC: health controls; tissue-based IIFA: tissue-based immunofluorescence assay; cell-based IIFA: cell-based immunofluorescence assay

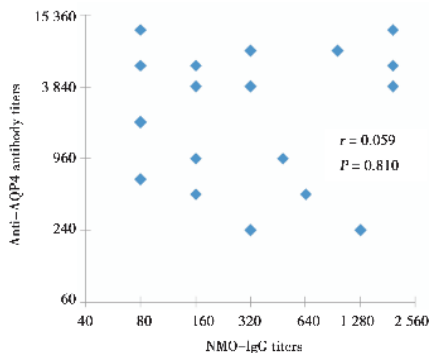


图 3 鼠脑法和细胞法检测 NMO-IgG/AQP4 抗体滴度的比较
Fig.3 NMO-IgG/anti-AQP4 antibody titers comparison between the two techniques

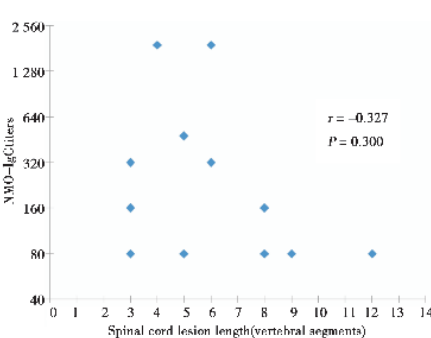


图 4 鼠脑法滴度和脊髓病变长度的相关性
Fig.4 Correlation between NMO-IgG titers and spinal cord lesion length
The spinal cord lesion length was expressed as the number of vertebral segments on T2-weighted images.

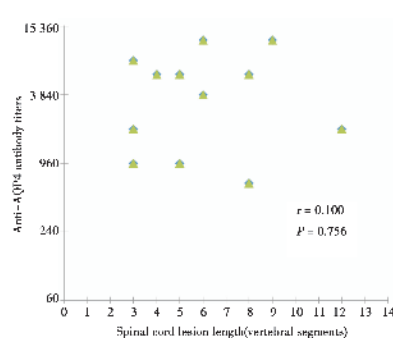


图 5 细胞法滴度和脊髓病变长度的相关性
Fig.5 Correlation between anti-AQP4 antibody titers and spinal cord lesion length
The spinal cord lesion length was expressed as the number of vertebral segments on T2-weighted images.

(70.6%), 13 例 LETM 中 9 例阳性 (69.2%), 31 例 MS 中 3 例阳性 (9.7%), 30 例 HC 中无一例检测到 AQP4 抗体。阳性血清滴度分布在 1:240-1:11 520 之间。

2.3 两种方法抗体滴度一致性的分析

19 例 NMO 患者中 12 例鼠脑法阳性 (63.2%), 17 例细胞法阳性 (89.5%), $P = 0.063$, 差异无统计学意义。17 例 RON 患者 8 例鼠脑法阳性 (47.1%), 12 例细胞法阳性 (70.6%), $P = 0.27$, 差异无统计学意义。13 例 LETM 患者 6 例鼠脑法阳性 (46.2%), 9 例细胞法阳性 (69.2%), $P = 0.076$, 差异无统计学意义。所有鼠脑法阳性的 NMO 和 LETM 患者细胞法均阳性, 有 2 例 RON 患者鼠脑法阳性, 细胞法阴性, 其鼠脑法滴度分别为 160 $\times$ 、320 $\times$ 。有 6 例 NMO 患者, 3 例 LETM 患者, 4 例 RON 患者鼠脑法阴性, 细胞法阳性, 阳性滴度分布于 1:240 ~ 1:11 520 之间。NMO 组两种方法血清抗体滴度比较采用 Mann-Whitney 秩和检验, $P = 0.002$, 差异有统计学意义, 由此推断本研究中细胞法检测血清中 NMO-IgG/抗 AQP4 抗体的敏感性高于鼠脑法。对于两种方法均为阳性的患者血清滴度进行 Spearman 秩相关分析, $P = 0.81$, 根据目前的数据尚不能认为该两方法检测的滴度呈线性相关。将累积脊髓病变长度和两种方法检测的滴度进行 Spearman 秩相关分析得出, 脊髓病变长度和鼠脑法滴度间 $r = -0.327$, $P = 0.300$, 脊髓病变长度和细胞法滴度间 $r = 0.100$, $P = 0.756$, 说明两种方法检测所得到的 NMO 疾病谱患者 NMO-IgG/AQP4 抗体滴度均和脊髓病变的长度无线性相关性。

3 讨 论

本研究首次对组织法和细胞法在检测 NMO-IgG/anti-AQP4 抗体滴度方面进行了一致性的研究。研究结果显示鼠脑法和细胞法在检测同一血清样本的 NMO-IgG/anti-AQP4 抗体滴度方面存在明显的不一致性。本研究也显示, 在两种方法的实用性综合比较中, 鼠脑法作为最原始和基础的方法, 重复性和可靠性好。而细胞法则更为敏感, 但易于受到细胞状态和判断标准的影响。

在 NMO-IgG/anti-AQP4 抗体滴度的检测方面, 2004 年 Lennon 等^[1]在报道该抗体时就应用鼠脑法的倍比稀释对抗体的滴度进行了初步的研

究, 发现不同病人抗体滴度的分布范围较广 (在阴性和 30720 之间), 但未对抗体滴度和疾病的相关性进行研究。2007 年 Takahashi 等^[4]应用细胞法滴度检测的方法对 anti-AQP4 抗体滴度在 NMO 疾病谱中进行了研究, 发现滴度范围在阴性和 65536 之间。提出抗体滴度的高低和完全失明和磁共振显示的脊髓病变的长度有关, Jarius 等^[8]对 6 个 NMO 患者和 2 个 LETM 患者进行长达 5 年时间随访发现同一患者复发期的血清抗体滴度显著高于缓解期, 在疾病发作前即有该抗体滴度的增高, 不伴其他抗体滴度的增高, 这些发现均提示血清 AQP4 抗体滴度对于提示病情进展, 治疗和预后有重要意义。然而本研究结果显示无论细胞法和鼠脑法均没有显示出抗体滴度和脊髓病变的长度具有相关性。另外本研究显示组织法和细胞法在检测 NMO-IgG/anti-AQP4 抗体滴度的一致性方面存在明显的差异, 其原因仍然有待于进一步研究。本研究也显示, 在两种方法的实用性综合比较中, 鼠脑法作为最原始和基础的方法, 重复性和可靠性较好。而细胞法虽更为敏感, 但易于受到细胞状态和判断标准的影响。在细胞法检测 anti-AQP4 抗体方面, 要形成一种高滴度的结合, 不仅要排除血清其他物质的干扰, 而且可能需要抗体的高浓度和高纯度。因而, 细胞法的结果可能受到多种因素的影响。此外目前国际部分主要的实验室在应用细胞法检测 anti-AQP4 抗体时, 多采用带有标签蛋白 (Tag protein) 的融合蛋白表达质粒, 标签蛋白是否造成对抗体滴度的影响有待于进一步研究。Apiwattanakul 等^[9]的研究显示 EGFP 可能会造成假阳性的结果。Waters 等^[10]的研究显示不带有标签蛋白的 AQP4 检测系统可能更为敏感。本研究使用的细胞法检测是基于表达 EGFP-AQP4, 因而也不能忽视标签蛋白可能对实验结果造成影响的可能性。

虽然在检测敏感性方面细胞法优于鼠脑法, 但细胞法并不能取代鼠脑法。国外报告的细胞法的敏感性为 42-91%, 相较 MS 的特异性为 94% ~ 100%^[4, 11-12]。Chan 等^[14]报道 78% 的 NMO 患者, 75% 的 LETM 患者和 33% 的 RON 患者细胞法阳性。国内孙巧松等^[7]检测发现 91.7% 的 NMO 患者和 86.4% 的 LETM 患者该法阳性。本研究发现 89.5% 的 NMO 患者, 70.6% 的 RON 患者和 69.2% 的 LETM 患者细胞法阳性, 与国内外报告基本一致。也有报道显示有超过 20% 的 NMO, 超过 50%

的 LETM 病人,NMO-IgG/AQP4-Ab 方法是阴性的,他们常鼠脑法阳性,细胞法阴性^[15]。而本研究发现有 2 例 RON 患者鼠脑法阳性而细胞法阴性。同时需注意的是 AQP4 抗体阴性并不能排除 NMO 的诊断,尤其在缓解期时抗体滴度降低或患者处在免疫抑制状态时。Jarius 等^[11]的研究显示血清 AQP4 抗体阴性的 NMO 患者,补体依赖的星型胶质细胞死亡较 MS 和正常人明显,提示 AQP4 抗体阴性的 NMO 患者血清中可能有未识别的抗体存在。此外,单向型 NMO 患者 AQP4 抗体常为阴性^[16]。

NMO-IgG 是中枢神经系统脱髓鞘疾病中发现的第 1 个特异性生物标记物。该抗体的发现使人们提出了 NMO 是免疫通道病的假说,并修订了 NMO 的诊断标准。新修订的标准使很多既往诊断为 MS 的病人可以诊断为 NMO。然而,应该认识到该抗体的检测目前还有很多不一致之处,其判断的标准也存在差异。此外,启动 AQP4 自身免疫的机制仍然不明确,该血清抗体如何穿过血脑屏障到达脑部的途径未明。目前的研究也发现结核性脑膜炎、副肿瘤综合症等疾病中存在该抗体,对该抗体的特异性提出了质疑^[17]。另外,本研究仍然同时需要进一步加大滴度检测的样本量,进行多因素的相关性分析,以期找到影响两种检测方法滴度相关的因素。

(本文图 1、图 2 见封 2)

参考文献:

- [1] Lennon VA, Wingerchuk DM, Kryzer TJ, et al. A serum autoantibody marker of neuromyelitis optica: distinction from multiple sclerosis [J]. *Lancet*, 2004, 364(9451): 2106-2112.
- [2] Lennon VA, Kryzer TJ, Pittock SJ, et al. IgG marker of optic-spinal multiple sclerosis binds to the aquaporin-4 water channel [J]. *J Exp Med*, 2005, 202(4): 473-477.
- [3] Wingerchuk DM, Lennon VA, Lucchinetti CF, et al. The spectrum of neuromyelitis optica [J]. *Lancet Neurol*, 2007, 6(9): 805-815.
- [4] Takahashi T, Fujihara K, Nakashima I, et al. Anti-aquaporin-4 antibody is involved in the pathogenesis of NMO: a study on antibody titre [J]. *Brain*, 2007, 130 (Pt 5): 1235-1243.
- [5] Wingerchuk DM, Lennon VA, Pittock SJ, et al. Revised diagnostic criteria for neuromyelitis optica [J]. *Neurology*, 2006, 66(10): 1485-1489.
- [6] McDonald WI, Compston A, Edan G, et al. Recommended diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines from the International Panel on the Diagnosis of Multiple Sclerosis [J]. *Ann Neurol*, 2001, 50(1): 121-127.
- [7] 孙巧松,刘俊秀,丰岩清,等.中国人视神经脊髓炎疾病谱 NMO-IgG/anti-AQP4 抗体检测方法学的比较 [J]. *中山大学学报:医学科学版*, 2010, 31(6): 872-877.
- [8] Jarius S, Aboul-Enein F, Waters P, et al. Antibody to aquaporin-4 in the long-term course of neuromyelitis optica [J]. *Brain*, 2008, 131(Pt 11): 3072-3080.
- [9] Apiwattanakul M, McKeon A, Fryer JP, et al. AQP4-IgG immunoprecipitation assay optimization [J]. *Clin Chem*, 2009, 55(3): 592-594.
- [10] Waters P, Leite MI, Palace J, et al. Cell-expressed untagged aquaporin-4 M23 isoform provides a more sensitive assay for detection of antibodies in neuromyelitis optica spectrum disorders [J]. *Ann Neurol*, 2010, 68(4): S55-S56.
- [11] Jarius S, Wildemann B. AQP4 antibodies in neuromyelitis optica: diagnostic and pathogenetic relevance [J]. *Nat Rev Neurol*, 2010, 6(7): 383-392.
- [12] Waters P, Jarius S, Littleton E, et al. Aquaporin-4 antibodies in neuromyelitis optica and longitudinally extensive transverse myelitis [J]. *Arch Neurol*, 2008, 65 (7): 913-919.
- [13] Chan KH, Kwan JS, Ho PW, et al. Aquaporin-4 autoantibodies in neuromyelitis optica spectrum disorders: comparison between tissue-based and cell-based indirect immunofluorescence assays [J]. *J Neuroinflammation*, 2010, 7(1): 50-56.
- [14] Jarius S, Probst C, Borowski K, et al. Standardized method for the detection of antibodies to aquaporin-4 based on a highly sensitive immunofluorescence assay employing recombinant target antigen [J]. *J Neurol Sci*, 2010, 291(1-2): 52-56.
- [15] Fujihara K. Neuromyelitis optica and astrocytic damage in its pathogenesis [J]. *J Neurol Sci*, 2011, 306(1-2): 183-187.
- [16] 孙巧松,刘俊秀,丰岩清,等. NMO-IgG/anti-AQP4 抗体的检测及其特异性的研究 [J]. *中华临床医师杂志:电子版*, 2010, 4(11): 2147-2152.

(编辑 刘清海)