

## 白细胞介素-10 对小鼠弓形虫眼病眼部炎症的影响

蔺雪静<sup>1,2</sup>, 吴欣怡<sup>1\*</sup>, 李元彬<sup>2</sup>, 于华军<sup>2</sup>, 孙英<sup>2</sup>, 张凤兰<sup>2</sup>

(1. 山东大学齐鲁医院眼科, 山东 济南 250012; 2. 烟台毓璜顶医院眼科, 山东 烟台 264000)

**摘要:**【目的】探讨白细胞介素-10(IL-10)对弓形虫眼病小鼠视网膜组织炎症和体内  $\gamma$ -干扰素(IFN- $\gamma$ )和肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )的影响。【方法】将 120 只 C57BL/6 小鼠分为 3 组:①对照组 40 只;②感染组(实验 A 组)40 只;③IL-10 干预组(实验 B 组)40 只。腹腔注射弓形虫感染小鼠后,观察小鼠眼部的组织学切片,对眼球和外周血做基因检测;注射 IL-10 后,观察其对眼部炎症反应和体内 IFN- $\gamma$  和 TNF- $\alpha$  水平的影响。【结果】弓形虫感染第 6 天,在实验组小鼠眼部和外周血中均可检测到小鼠 P30 基因;房水中 IFN- $\gamma$ (4531.4 pg/mL)和 TNF- $\alpha$ (1572.3 pg/mL)的浓度升高;血清中 IFN- $\gamma$ (456  $\pm$  39) pg/mL 和 TNF- $\alpha$ (14.6  $\pm$  2.2)pg/mL 的浓度升高;视网膜组织可见到弓形虫,且出现明显的炎症反应;IL-10 注射后,房水中 IFN- $\gamma$ (2482.7 pg/mL)和 TNF- $\alpha$ (1248.1 pg/mL)的浓度降低,血清中 IFN- $\gamma$ (266  $\pm$  27)pg/mL 和 TNF- $\alpha$ (12.1  $\pm$  1.9)pg/mL 的浓度降低,但仍高于对照组,视网膜组织中仍可见到弓形虫,但炎症反应减轻,将三组血清中两种细胞因子的浓度组间差异进行方差分析, $P < 0.01$ ,表明差别具有统计学意义。【结论】小鼠急性眼部弓形虫感染病变主要集中在视网膜,IL-10 可减轻弓形虫感染小鼠的眼部炎症反应。

**关键词:** 弓形虫眼病; 白细胞介素-10; 炎症;  $\gamma$ -干扰素; 肿瘤坏死因子- $\alpha$

**中图分类号:** R774      **文献标志码:** A      **文章编号:** 1672-3554(2011)05-0664-05

### Effect of Interleukin-10 in Inflammation of Murine Ocular Toxoplasmosis

MAN Xue-jing<sup>1,2</sup>, WU Xin-yi<sup>1</sup>, LI Yuan-bin<sup>2</sup>, YU Hua-jun<sup>2</sup>, SUN Ying<sup>2</sup>, ZHANG Feng-lan<sup>2</sup>

(1. Department of Ophthalmology, Qilu Hospital of Shandong University, Jinan 250012, China; 2. Department of Ophthalmology, Yantai Yuhuangding Hospital, Yantai 264000, China)

**Abstract:** 【Objective】 To understand the effect of interleukin-10 in retinal inflammation, the concentration of IFN- $\gamma$  (interferon- $\gamma$ ) and TNF- $\alpha$  (tumor necrosis factor- $\alpha$ ) in vivo of murine ocular toxoplasmosis. 【Methods】 One hundred and twenty C57BL/6 mice were divided into three groups: forty mice in the control group, forty mice in the infection group (experiment A) and forty mice in the injecting IL-10 group (experiment B). *Toxoplasma gondii* infected mice by intraperitoneal injection. Histological sections of the three groups were detected. The DNA of *Toxoplasma gondii* in eyes and serum were detected. The concentration of IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$  in eyes and serum were detected in experimental groups. 【Results】 P30 gene could be detected in experiment groups on the sixth day. Compared with the control group, the concentration of IFN- $\gamma$  (4531.4 pg/mL) and TNF- $\alpha$  (1572.3 pg/mL) in aqueous humor was higher in experiment A group; and the concentration of IFN- $\gamma$  (456  $\pm$  39 pg/mL) and TNF- $\alpha$  (14.6  $\pm$  2.2 pg/mL) in serum was higher in experiment A group too. Toxoplasm and apparent inflammation were watched in retina. Compared with the experiment A group, the concentration of IFN- $\gamma$  (2482.7 pg/mL) and TNF- $\alpha$  (1248.1 pg/mL) in aqueous humor was lower in experiment B group, and the concentration of IFN- $\gamma$  (266  $\pm$  27 pg/mL) and TNF- $\alpha$  (12.1  $\pm$  1.9 pg/mL) in serum was lower in experiment B group too. Mean square analysis about the concentration of IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$  in serum was carried out between the three groups. The difference was statistical significance ( $P < 0.01$ ). Toxoplasm and light inflammation were watched in retina. 【Conclusion】 *Toxoplasma gondii* damaged retina. IL-10 could relieve inflammation of murine ocular toxoplasmosis.

**Key words:** ocular toxoplasmosis; interleukin-10; inflammation; interferon- $\gamma$ ; tumor necrosis factor- $\alpha$

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2011, 32(5): 664-668]

收稿日期: 2011-06-07

基金项目: 烟台市科技发展计划(2011 年)

作者简介: 蔺雪静, 博士, 主治医师, E-mail: manxuejing@yahoo.com.cn; \* 通信作者: 吴欣怡, 教授, E-mail: xywu8868@163.com

弓形虫病是全球分布的人兽共患的疾病,是弓形虫引起的全身性感染性寄生虫病<sup>[1]</sup>。人类普遍易感,全世界 30% 的人感染弓形虫<sup>[2]</sup>。弓形虫是一种机会性专性细胞内寄生原虫,弓形虫可侵犯人体多个器官,对于免疫功能正常的宿主,弓形虫不引起临床症状,以包囊形式在肌肉和神经等组织中存活。对于免疫力低下的宿主,弓形虫包囊活化引起严重的临床疾病,如弓形虫脑炎、脑膜脑炎、视网膜脉络膜炎、肺炎、心肌炎等<sup>[3]</sup>。以往普遍认为弓形虫眼病多半为先天性感染,获得性弓形虫感染并发眼部症状者少见。但是,近年来发现情况并非如此。如在巴西南部调查结果显示,21% 的弓形虫眼病为获得性感染,在葡萄膜炎患者中达 60% 之多<sup>[4]</sup>。获得性弓形虫眼部感染通过免疫介导,引起坏死性视网膜或视网膜脉络膜炎<sup>[5]</sup>,重症的色素膜炎,可导致视网膜脱离、青光眼及眼内炎而失明<sup>[6]</sup>。弓形虫感染导致弓形虫眼病的发病机制尚不十分清楚。国内对弓形虫眼病的发病机制研究少见。文献表明弓形虫眼病中细胞免疫和体液免疫均发挥重要作用。弓形虫感染小鼠后,组织病理学可见到自然杀伤细胞、多形核白细胞、巨噬细胞、CD4<sup>+</sup>T 和 CD8<sup>+</sup>T 淋巴细胞。CD4<sup>+</sup>T 与 CD8<sup>+</sup>T 细胞受到弓形虫抗原刺激后均分泌  $\gamma$ -干扰素(interferon- $\gamma$ , IFN- $\gamma$ ) 和肿瘤坏死因子- $\alpha$ (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )<sup>[7]</sup>, IFN- $\gamma$  和 TNF- $\alpha$  在巨噬细胞活化、杀灭寄生虫方面十分重要,是机体对抗弓形虫侵害的主要活性分子。但是,过量的 IFN- $\gamma$  和 TNF- $\alpha$  可能导致免疫应答过度,加重组织的炎症反应甚至导致组织坏死等。而内源性 IL-10 在保护性免疫和免疫病理的平衡中则起着重要作用<sup>[8]</sup>,那么外源性 IL-10 干预对弓形虫眼病是否发挥作用,文献中未见到此类报道。本研究的目的是通过弓形虫急性感染小鼠建立获得性弓形虫眼病动物模型,观察小鼠弓形虫急性感染后引起的眼部损害,对感染小鼠通过外源性 IL-10 进行干预,观察了干预后小鼠眼部炎症反应和体内 IFN- $\gamma$  和 TNF- $\alpha$  的影响。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物和虫株

清洁级 C57BL/6 小鼠,6~8 周龄,质量 32~35 g,雌雄各 60 只,购自上海斯莱克实验动物有限

责任公司。弓形虫 RH 株由上海交通大学引进,为常规标准强毒株。无菌操作下取弓形虫滋养体,经腹腔注射感染小鼠,连续传代保虫。PCR 所用的 Buffer、dNTP、Taq 酶等试剂购于上海硕世生物科技有限公司。

### 1.2 感染实验动物

将 120 只实验动物随机分为 3 组,对照组 40 只,单纯弓形虫感染组 40 只, IL-10 干预组 40 只。在无菌条件下,实验组小鼠经腹腔注射感染的方式给予  $10^2$  个/只弓形虫(0.2 mL),对照组小鼠注射等体积的生理盐水,实验组中 IL-10 干预组分别于感染虫体后第 2 天和第 4 天通过尾静脉注射 0.1  $\mu$ g IL-10(溶于 200  $\mu$ L 无菌生理盐水中)。

### 1.3 取材

小鼠感染弓形虫后第 6 天处死所有小鼠,分别摘除眼球取血约 0.1 mL。将取下的眼球,用角膜剪剪去眼球周围组织,沿角膜缘穿刺抽取房水,因小鼠的房水含量极少,将每组小鼠的所有房水集中到一管内,三组共收集到三管房水备用。每组内每只小鼠的外周血分别收集备用。摘除眼球后放入 FFA 固定液中(100 mL/L 中性甲醛溶液 10 mL、950 mL/L 的乙醇 85 mL、冰醋酸 5 mL 的混合液)浸泡 1 min 后,再用 100 mL/L 中性甲醛溶液固定过夜<sup>[8]</sup>。

### 1.4 石蜡切片和 HE 染色

将固定好的眼球进行脱水,体积分数为 95% 的乙醇脱水 1 h,无水乙醇 I、无水乙醇 II 各脱水 10 min,二甲苯透明 3~4 min,60  $^{\circ}$ C 石蜡浸蜡 2 h,矢状位包埋眼球。切片厚度为 3  $\mu$ m,65  $^{\circ}$ C 烤片 1 h。每个眼球取 2 片进行 HE 染色。常规石蜡切片脱蜡至水,苏木素染色 15 min,体积分数 1% 的盐酸乙醇分化 1~2 min,自来水洗,体积分数 1% 的氨水返蓝 8~10 s,自来水洗 30 min,体积分数 1% 的伊红染色 3 min,梯度乙醇脱水,二甲苯透明,中性树脂胶封片,显微镜下观察。

### 1.5 PCR 检测

按照 Tissue DNA Kit 和 Blood DNA Kit 操作手册提取小鼠的眼球和外周血的 DNA。根据文献<sup>[9]</sup>设计 P30 基因套式 PCR 扩增的两对引物 P30W 和 P30N,四条引物长度均为 20 bp,具体序列为:P30WF,5-TTGCCGCGCCACACTGATG-3;30WR,5-CGCGACACAAGCTGCGATAG-3;P30NF,5-CGA

CAGCCGCGGTCATTCTC-3; P30NR, 5-GCAACCAGTCAGCGTCC-3。引物由上海生物工程有限公司合成, 预期扩增片段为 522 bp。第一次 PCR 反应体系: 50  $\mu\text{L}$  反应体系中加入 10  $\times$  PCR buffer 5  $\mu\text{L}$ , 2.5 mmol/L dNTP 4  $\mu\text{L}$ , P30WF 和 P30WR 各 1  $\mu\text{L}$ , Taq 酶 0.2  $\mu\text{L}$ , DNA 模板 10  $\mu\text{L}$ , 灭菌超纯水 28.8  $\mu\text{L}$ 。扩增程序: 95  $^{\circ}\text{C}$  5 min; 94  $^{\circ}\text{C}$  0.5 min, 55  $^{\circ}\text{C}$  0.5 min, 72  $^{\circ}\text{C}$  1 min, 共 35 次循环; 72  $^{\circ}\text{C}$  10 min。用 P30NF 和 P30NR 各 1  $\mu\text{L}$  进行套式 PCR, 反应体系中的模板为第 1 次 PCR 扩增产物 1  $\mu\text{L}$ , 其它与第一次 PCR 反应体系成分相同, 扩增程序: 95  $^{\circ}\text{C}$  5 min; 94  $^{\circ}\text{C}$  0.5 min, 60  $^{\circ}\text{C}$  0.5 min, 72  $^{\circ}\text{C}$  1 min, 共 35 次循环; 72  $^{\circ}\text{C}$  10 min。

#### 1.6 测定房水和血清中 TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ 的浓度

将收集的小鼠外周血 4  $^{\circ}\text{C}$  离心 (2 500 r/min,  $r = 10$  cm) 10 min, 取血清, 按试剂盒操作说明, 采用双抗体夹心 ELISA 法, 分别对血清和房水中的 TNF- $\alpha$  和 IFN- $\gamma$  含量进行检测。根据试剂盒操作步骤进行, 用酶标仪测定 450 nm 处各孔吸光度值, 根据标准曲线, 计算细胞因子含量 (pg/mL)。

#### 1.7 统计学分析

对血清中检测到的 IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$  实验结果各组间采用 SAS 8.2 软件包进行方差分析, 实验数结果以均数  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示,  $P < 0.05$  表示差异有统计学意义。

## 2 结 果

#### 2.1 感染弓形虫对小鼠生理状态的影响

小鼠在接种弓形虫 2 ~ 3 d 以后, 开始出现活动减少, 弓背, 逆毛, 精神状态差, 闭眼, 缩腹, 腹毛处有横向纹理, 尿黄、黏稠, 阴门周围沾有尿迹。随着感染时间增加, 症状逐渐加重。对照组小鼠食欲佳, 精神状态好, 反应敏捷。

#### 2.2 感染弓形虫对小鼠视网膜组织形态学的影响

下列图片分显示了正常视网膜组织形态学特点 (图 1A)、单纯弓形虫感染鼠视网膜组织形态学特点 (图 1B)、IL-10 干预组鼠视网膜组织形态学特点 (图 1C)。

#### 2.3 P30 基因的 PCR 扩增

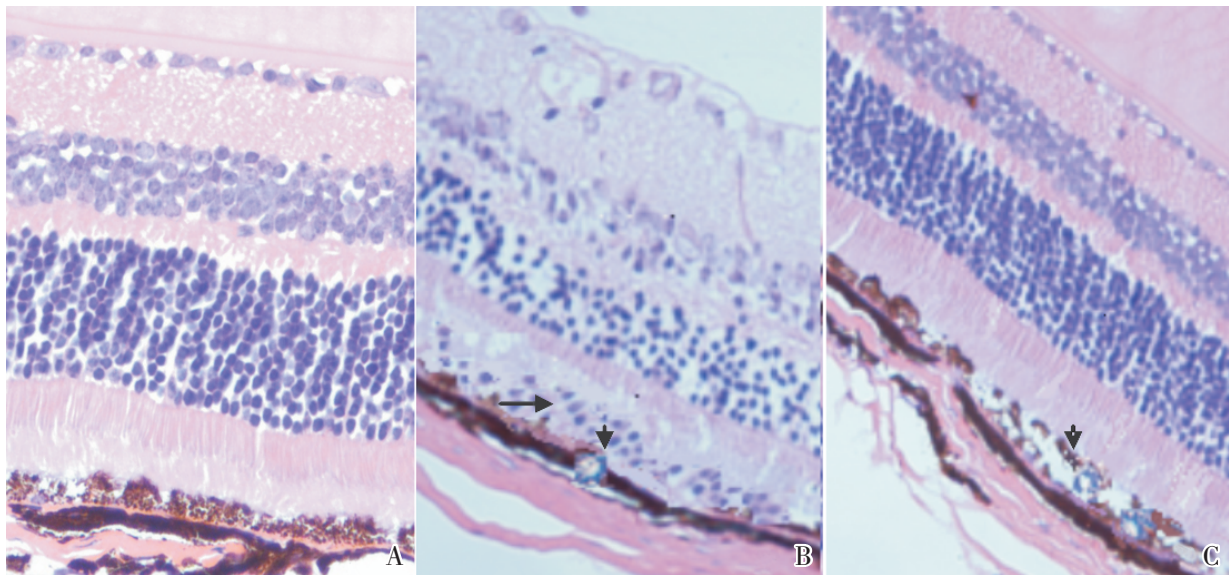


图 1 光镜下正常对照组、弓形虫感染组、IL-10 干预组鼠眼视网膜组织学切片

Fig.1 Light micrograph of retinal sections from control group, infection group, and injecting IL-10 group

A: light micrograph of retinal sections from control mouse eyes, showed that there were no edema of the interstitial space between the segments, and there were no *Toxoplasma gondii* in retinal pigment epithelium; B: light micrograph of retinal sections from eyes of mouse infected *Toxoplasma gondii* without IL-10 showed that Obvious edema of the interstitial space between the segments, forming lacunae, and inflammatory infiltrate in retinal outer layer (long arrow), and *Toxoplasma gondii* were in retinal pigment epithelium (short arrow); C: light micrograph of retinal sections from eyes of mouse infected *Toxoplasma gondii* with IL-10 injected to vena caudalis, showed that obvious edema of the interstitial space between the segments, forming lacunae, and *Toxoplasma gondii* were in retinal pigment epithelium (short arrow). HE,  $\times 40$ .

所有感染组和干预组眼球和外周血标本的弓形虫 DNA 经扩增后都出现 522 bp 的目的条带,表明弓形虫感染率为 100%。由图 2A 和图 2B 可见实验组小鼠的外周血和眼球标本 DNA 经扩增后都出现 522 bp 的弓形虫目的条带,而作为对照组小鼠外周血和眼球标本则无相应的条带。

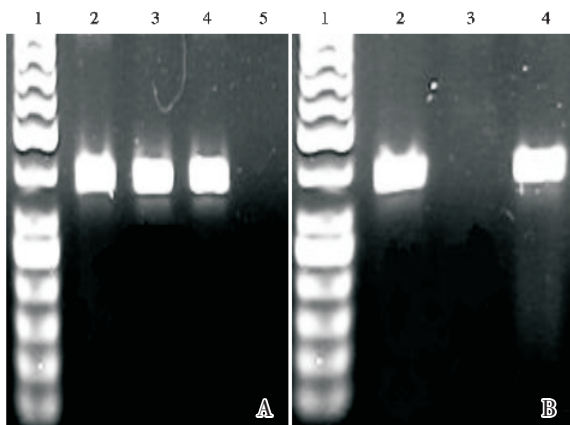


图 2 1.5% 琼脂糖凝胶电泳获得的外周血和眼球组织中弓形虫 RH 株 P30 基因 PCR

Fig.2 1.5% Gel electrophoresis analysis of PCR product of P30 gene from peripheral blood (A) and eye tissues (B)

A: Lane 1, DNA marker; Lane 2, PCR product of P30 gene from *Toxoplasma*; Lane 3, PCR product of P30 gene from infected group blood; Lane 4, PCR product of P30 gene from IL-10 intervention group blood; Lane 5, PCR product of P30 gene from control group blood. B: Lane 1, DNA marker; Lane 2, PCR product of P30 gene from infected group eyes; Lane 3, PCR product of P30 gene from control group eyes; Lane 4, PCR product of P30 gene from IL-10 intervention group eyes.

#### 2.4 弓形虫感染对小鼠血清和房水中 IFN- $\gamma$ 和 TNF- $\alpha$ 浓度的影响

鼠腹腔感染弓形虫后 6 d, 通过 ELISA 实验定量分析检测鼠眼房水和血清中可溶性细胞因子 IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$ , 每组房水集中收集, 检测结果如表 1。对血清中检测到的 IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$  实验结果采用 SAS 8.2 软件包进行方差分析, 显示各组间浓度差别有统计学意义(表 2)。

### 3 讨论

我们在国内首先尝试用弓形虫(RH 株)通过腹腔注射来感染小鼠, 实验组眼球组织学切片见到了弓形虫体, 且在眼球和外周血标本的 PCR 检

表 1 不同组房水中 IFN- $\gamma$  和 TNF- $\alpha$  的浓度

Table 1 Comparison of IFN- $\gamma$  level and TNF- $\alpha$  in aqueous humor between different group (pg/mL)

Groups	IFN- $\gamma$	TNF- $\alpha$
Control	12.3	1165.2
Experiment A	4531.4	1572.3
Experiment B	2482.7	1248.1

表 2 不同组血清中 IFN- $\gamma$  和 TNF- $\alpha$  的浓度比较

Table 2 Comparisons of IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$  level in serum between different group ( $\bar{x} \pm s$ , pg/mL)

Groups	IFN- $\gamma$ /(pg/mL)	TNF- $\alpha$ /(pg/mL)
Control	16 $\pm$ 3	8.7 $\pm$ 2.1
Experiment A	456 $\pm$ 39	14.6 $\pm$ 2.2
Experiment B	266 $\pm$ 27	12.1 $\pm$ 1.9
<i>F</i>	2544.0	84.8
<i>P</i>	< 0.01	< 0.01

测中均检测到了弓形虫 P30 基因, 表明获得性弓形虫眼病模型成功建立。P30 是一种表面抗原, 存在于迅速增殖的弓形虫速殖子, 具有高度的抗原性和免疫原性, 在虫体的入侵和虫株的毒力等方面发挥着重要的作用<sup>[9]</sup>。P30 在速殖子内高度转录, 并且其引物具有高度的保守性、敏感性和特异性。Kazumi 等<sup>[10]</sup>人的研究表明由于血眼屏障的作用弓形虫出现在视网膜、脉络膜及巩膜的时间为感染后的第 10 天, 且在第 12 天的时候弓形虫在眼内的数目最多。Niclas 等<sup>[11]</sup>通过体内荧光成像证实弓形虫感染 BALB/c 小鼠第 6 天, 眼内即可检测到虫体。本实验通过腹腔注射的途径感染, 接种数量为  $10^2$  个 RH 株弓形虫, 感染后第 6 天, 应用套式 PCR 法, 根据弓形虫 P30 基因设计的引物 P30W 和 P30N 进行扩增, 结果显示在感染的第 6 天眼球和外周血标本扩增中都出现了预期的扩增片段 522 bp, 实验结果表明套式 PCR 法检测弓形虫眼病高度敏感, 可以成为弓形虫眼病的重要诊断指标。

弓形虫感染的免疫反应复杂, 眼球等免疫赦免器官对弓形虫感染的免疫反应具有明显的组织特异性。弓形虫感染小鼠后, 眼部组织病理学可见到自然杀伤细胞、多形核白细胞、巨噬细胞、CD4<sup>+</sup>T 和 CD8<sup>+</sup>T 淋巴细胞。CD4<sup>+</sup>T 细胞受抗原刺激后可分化 Th1/Th2 两个亚群, Th1 细胞主要分泌 IFN-

$\gamma$ 、IL-2、TNF- $\alpha$  等细胞因子,介导细胞免疫应答; Th2 细胞主要分泌 IL-4、IL-5、IL-6、IL-10 和 IL-13 等细胞因子,辅助体液免疫应答<sup>[2]</sup>。其中, TNF- $\alpha$  和 IFN- $\gamma$  是机体抑制弓形虫生长的主要细胞分子。但是,过量的 IFN- $\gamma$  和 TNF- $\alpha$  可能导致免疫应答过度,加重组织的炎症反应甚至导致组织坏死等。Lu 等<sup>[12]</sup>通过小鼠弓形虫眼病模型实验得出结论:IL-10 对宿主抗弓形虫 RH 株感染具有重要的保护作用,可抑制 IFN- $\gamma$  和 TNF- $\alpha$  的生成。从而认为 IL-10 通过减低 IFN- $\gamma$  和 TNF- $\alpha$  的浓度在保护性免疫和免疫病理的平衡中起着重要作用。我们的实验表明,弓形虫感染组小鼠较正常对照组的血清和房水中的 IFN- $\gamma$  和 TNF- $\alpha$  浓度明显升高,眼部视网膜和脉络膜组织出现明显的炎症反应。IL-10 干预后,感染组小鼠的血清和房水中 IFN- $\gamma$  和 TNF- $\alpha$  的浓度较未干预前降低,但仍高于正常对照组,眼部组织的炎症反应减轻对 3 组动物血清中的两种细胞因子浓度差异进行统计学分析有统计学意义。因此推测,外源性 IL-10 有可能成为弓形虫眼病的一种新的治疗方法。

本实验通过弓形虫急性感染小鼠建立获得性弓形虫眼病的动物模型,观察小鼠弓形虫急性感染后引起的眼部损害,进一步明确了弓形虫急性感染眼部的组织学特征,并通过相关检测和细胞因子干预,为弓形虫眼病的诊断和治疗提供了参考。

#### 参考文献:

- [1] 赵慰先. 人体寄生虫学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1994: 257-267.
- [2] Jones LA, Alexander J, Roberts CW. Ocular toxoplasmosis: in the storm of the eye [J]. *Parasite Immunol*, 2006, 134(28): 635-642.
- [3] 毛海燕, 胡世兴. 我国弓形虫眼病及治疗现状[J]. *眼科研究*, 2002, 12(20): 565-567.
- [4] Glasner PD, Silveira C, Kruszon-Moran D, et al. An unusually high prevalence of ocular toxoplasmosis in southern Brazil [J]. *Am J Ophthalmol*, 1992, 114(2): 136-144.
- [5] 高艺, 胡世兴. 眼弓形虫病基础及临床研究进展[J]. *国外医学眼科学分册*, 2001, 25(3): 160-165.
- [6] 徐明生. 弓形虫病. *热带病与寄生虫学* [J]. 1996, 25(3): 174-177.
- [7] 万磊, 刘廷, 刘伟吉, 等. 小鼠视网膜组织石蜡切片制作方法的探讨[J]. *眼科新进展*, 2009, 3(29): 161-164.
- [8] Lu F, Huang S, Kasper LH. Interleukin-10 and pathogenesis of murine ocular toxoplasmosis [J]. *Infect Immun*, 2003, 71(12): 7159-7163.
- [9] 王胜昌, 谢建云, 邵伟娟, 等. 弓形虫 PCR 检测方法的建立及初步应用[J]. *上海实验动物科学*, 2003, 23(1): 15-17.
- [10] Kazumi N, Hye-Seong M, Fumie A, et al. IFN- $\gamma$ -regulated toxoplasma gondii distribution and load in the murine eye [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2003, 44(10): 4375-4381.
- [11] Niclas H, Isabel D, Barbara A, et al. Dissemination of toxoplasma gondii to immunoprivileged organs and role of toll/interleukin-1 receptor signalling for host resistance assessed by in vivo bioluminescence imaging [J]. *Cell Microbiol*, 2005, 7(6): 837-848.
- [12] Lu F, Huang S, Kasper LH. The temperature-sensitive mutants of *Toxoplasma gondii* and ocular toxoplasmosis [J]. *Vaccine*, 2009, 27(4): 573-580.

(编辑 刘清海)