

·基础研究·

Fmoc固相直接法合成 A₁₋₁₅ 肽疫苗及其免疫活性杨学森^{1,2}, 汪华侨¹, 袁群芳¹, 谢瑶¹, 姚志彬¹, 叶小舟², 吴继明², 邹爱国²

(1. 中山大学基础医学院人体解剖学教研室, 广东 广州 510080; 2. 中炬高新技术实业股份有限公司博士后工作站, 广东 中山 528437)

摘要【目的】探讨实验室合成 A₁₋₁₅ 肽疫苗的方法, 并对其进行鉴定。【方法】选取 A₄₂ 主要包含 B 细胞抗原决定簇的片段 A₁₋₁₅, 采用 8 分支多重抗原肽系统, 以 Fmoc 固相直接法合成 MAP A₁₋₁₅; 用 MAP A₁₋₁₅ 疫苗免疫接种 C57BL/6 小鼠, ELISA 检测血清特异性抗 A₁₋₁₅ 抗体。【结果】用 Fmoc 法直接合成方法成功制备 MAP A₁₋₁₅ 疫苗, 质谱检测其主要离子峰的相对分子质量为 15 458, 与理论相对分子质量 15 451 十分接近, 但还有其它不同分子质量的离子峰存在。以合成的 MAP A₁₋₁₅ 免疫 C57BL/6 小鼠后, 可产生高滴度的特异性抗 A₄₂ 抗体, 第 3 次接种后抗体平均滴度为 1:467 ± 196, 第 5 次免疫接种后, 平均滴度为 1:4 367 ± 120。对照组的血清抗体检测基本无明显变化。【结论】Fmoc 固相直接法可成功合成出 MAP A₁₋₁₅, 合成出的 MAP A₁₋₁₅ 具有很好免疫活性。

关键词: Fmoc 固相多肽直接合成; 多重抗原肽; A₁₋₁₅ 疫苗; 阿尔茨海默病

中图分类号: R749.1

文献标识码: A

文章编号: 1672-3554(2006)02-0121-05

Directly Synthesize A₁₋₁₅ Peptide Vaccine by Fmoc Solid-phase Peptide Synthesis and Study Its Immune ActivityYANG Xue-sen^{1,2}, WANG Hua-qiao¹, YUAN Qun-fang¹, XIE Yao¹, YAO Zhi-bin¹, YE Xiao-zhou², WU Ji-ming², ZHOU Ai-guo²

(1. Department of Anatomy, The School of Preclinical Medicine, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510080, China; 2. Work Station of Postdoctor in Jonjee Hi-tech Industrial Commercial Holding Company Limited, Zhongshan 528437, China)

Abstract: 【Objective】To explore how to synthesize the A₁₋₁₅ peptide vaccine and identify the quality and the immune activity of synthesized A₁₋₁₅ peptide vaccine. 【Methods】To synthesize multiple antigenic peptide A₁₋₁₅ by Fmoc solid-phase peptide directly synthesis. The molecular of synthesized MAP A₁₋₁₅ was analyzed by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometric (MALDI-TOF MS). C57BL/6 mice were immunized with synthesized A₁₋₁₅ vaccine. The specific anti-A₁₋₁₅ antibody in the serum of immunized mice was identified by ELISA. 【Results】The molecular weight of main component in synthesized MAP A₁₋₁₅ was 15 458, and it was quite near standard molecular weight of 15 451. Besides the main component, there were still others of different molecular weight. High titer of anti A₁₋₁₅ antibody was induced in C57BL/6 mice after inoculated with MAP A₁₋₁₅, the average titer was 1 467 ± 196 and 1 4 367 ± 120 after third and fifth time inoculated, respectively. 【Conclusion】MAP A₁₋₁₅ could be synthesized successfully by Fmoc solid-phase peptide directly synthesis. The synthesized complex has significant immune activity.

Key words: Fmoc solid-phase peptide directly synthesis; multiple antigenic peptide; A₁₋₁₅ vaccine; Alzheimer disease

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2006, 27(2):121-125]

收稿日期: 2005-11-11

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30400512); 粤港关键领域重点突破项目(20054982210); 广东省自然科学基金重大资助项目(20013137); 广东省自然科学基金资助项目(04300218); 广东省社会发展基金资助项目(2005B10401047); 广州市科技计划基金资助项目(2004Z3-E0151, 2005Z3-E4-021); 中山市科技局重点攻关基金资助项目(4209606), 中国博士后科学基金资助项目(2004035603)

作者简介: 杨学森(1972-), 男, 重庆市人, 博士后, 讲师, 姚志彬, 博士后指导老师, 课题主持人, 通讯作者. E-mail: anatomy@gzsums.edu.cn
(C)1994-2019 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

针对 β -淀粉样蛋白(amyloid- protein, A₄₂)为靶采用主动免疫进行老年性痴呆(Alzheimer's disease, AD)治疗具有明确疗效。自 1999 年 Schenk 等^[1]首次采用 A₄₂ 治疗 AD 疫苗转基因模型鼠成功后,英国 Elan 公司进行 AD 疫苗 AN1792 的临床试验,但由于临床 期试验中约 5%接种病人出现非炎性脑膜脑炎等不良反应,实验被迫中止^[2]。这可能是 AN1792 采用的 A₄₂ 全长片段的 C 端含有 T 细胞抗原决定簇,在 QS21 作用下会过度激活 T 细胞,从而产生 T 细胞浸润性脑膜脑炎^[3]。据此,我室成功构建以 A₄₂ 亚单位片段为主要成分的新型 AD 疫苗(专利申请号 CN:03114042.4),选用 A₄₂ 主要包含 B 细胞抗原决定簇的 N 端片段 A₁₋₁₅ 为免疫原^[4];合成的 A₄₂ 亚单位疫苗可有效诱导大鼠^[5]、猴^[6]产生高滴度的抗 A₄₂ 特异性抗体,且对接种鼠的认知行为无影响^[7],免疫鼠血清能在体外抑制 A₄₂ 对细胞产生的毒性作用^[7]。本研究探讨采用 Fmoc 固相合成法直接合成 8 分支 MAP A₁₋₁₅,并与 MF59 组成 A₁₋₁₅ 肽疫苗,观察其免疫活性。

1 材料与方 法

1.1 试剂与仪器

所有 Fmoc 保护氨基酸 Lys (Fmoc)-OH、Arg-(Pbf)-OH、Ala-OH、Asp(OtBu)-OH、Glu(OtBu)-OH、His (Trt)-OH、Phe-OH、Ser (tBu)-OH、Gly-OH、Tyr (tBu)-OH、Val-OH、Gln (Trt)-OH 及王树脂(HPM resin) 由美国 ABI 公司提供,二甲基甲酰胺(DMF)、1-羟基苯并三唑(HOBT)、N-甲基吗啉(NMM)、三氟乙酸(TFA)、二氯甲烷(DCM)、NN-二环己基碳二酰亚胺(DCC)、4-二甲基氨基嘧啶(DMAP)、N-甲基吡咯烷酮(NMP)均购自 Sigma 公司。

ABI 431 多肽合成仪(Applied Biosystems, 美国)、Waters prep LC-4000 System 高效反相液相色谱仪(Waters, 美国)、Ettan MALDI-ToF/Pro 基体辅助激光解吸电离-飞行质谱仪(Amersham Bioscience, 美国)、低压旋转蒸发器(Heidolph, 德国)、冷冻干燥机(Christ, 德国)。

1.2 实验动物

12 只健康 C57BL 小鼠,由中山大学实验动物实验中心提供,6~8 周龄,体质量约 20 g,随机分

为对照组与实验组(每组 6 只)。

1.3 MAP 抗原肽的设计

选取 A₁₋₁₅ 序列为:A₁₋₁₅:H-Asp-Ala-Glu-Phe-Arg-His-Asp-Ser-Gly-Tyr-Glu-Val-His-His-Gln-COOH; DAEFRHDSGYEVHHQ 采用 8 分支肽设计,MAP A₁₋₁₅ 结构示意图见图 1。

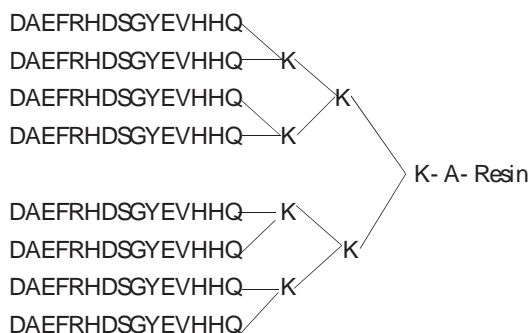


图 1 MAP 结构示意图

Fig.1 Schematic structure of MAP

1.4 Fmoc 固相合成

采用直接合成法策略,首先合成 8 分支 MAP 核心结构,然后在 MAP 核心结构最末端 4 个赖氨酸的 8 个氨基端同时偶联氨基酸,其顺序是按照 A₁₋₁₅ 的氨基酸序列从羧基端向氨基端依次逐个连接。

1.4.1 MAP 核心结构的合成 将赖氨酸连接到王树脂,连接三级形成 8 分支核心结构。称量王树脂 0.1 mmol,再按照树脂:氨基酸=1:5 的反应比例称量第 1 次反应赖氨酸,然后按倍比增加依次称量第 2 次和第 3 次反应赖氨酸。在 ABI 431 多肽合成仪上设置标准程序进行偶联合成:3 mL DCM 溶涨树脂 2 h,抽干后再以 DCM 洗树脂 3 次,1 min。连接赖氨酸,将赖氨酸以 NMP/DCM 混合液溶解,转入活化腔,加入 DCC 活化氨基酸。将活化的赖氨酸转入反应腔中进行偶联,加入 1/10 体积的 DMAP,搅拌 20 min,然后以 DMAP 洗树脂 2 次,1 min,以 DCM 洗树脂 2 次,1 min。连接第二级赖氨酸:去除 Fmoc 保护基团,先用 NMP 溶解,再以 200 g·L⁻¹ 吡啶/NMP 处理 2 次,第 1 次 3 min,第 2 次 15 min,然后抽干,最后再以 NMP 冲洗 1 次。活化氨基酸,在去除保护的赖氨酸中加入 2.1 mL NMP 和 1 mL 1 mol/L HoBt,15 min 终止混合,溶解的赖氨酸移到活化腔,加入 1 mL 1 mol/L DCC 活化。偶联:将活化的赖氨酸从活化腔转入到

反应腔,与已连接在树脂上的赖氨酸偶联反应 70 min。同样依此连接第三级赖氨酸。最后完成 8 分支树脂合成,合成量为 0.197 4 g,根据树脂结合氨基位点计算,相当于 0.8 mmol。

1.4.2 在 MAP 核心结构上依次连接合成 A₁₋₁₅ 称取相当于 0.1 mmol 的 8 分支树脂 0.03 g。按照树脂 氨基酸=1 5 的反应比例,氨基酸反应量为 0.5 mmol,根据肽段序列称量氨基酸,并将原料瓶按顺序放入进样槽。按照标准规模 Fmoc 合成方案设定合成程序,重复去保护基团、活化、偶联的步骤,最后在每个分支上合成 A₁₋₁₅₀。

1.4.3 树脂裂解和去保护 连接有 8 分支肽的树脂从反应腔中仔细取出,放入 10 mL 圆底烧瓶中,倒入 5 mL 预先配制好的裂解试剂(三氟乙酸 90%、苯甲硫醚 5%、二巯基乙烷 3%、苯甲醚 2%),密闭,然后放在磁力搅拌器上室温下旋转搅拌反应 2 h。反应完后,将反应液倒出过滤,收集过滤液,再以 1 mL TFA 洗涤剩余树脂 2 次,收集滤液。将所有滤液一起倒入旋转蒸馏瓶内,40 ℃ 恒温低压旋转蒸发,残留少许时,再加入甲醇 5 mL,震荡溶解,再次低压旋转蒸发,重复 2 遍。将三蒸水倒入蒸馏瓶中,溶解蒸发后的剩余物,并以等体积乙醚与之震荡混合,并萃取水相,即为 8 分支 MAP 肽水溶液。

1.4.4 MAP 肽的制备与纯化 在 Waters Delta 600 高效反相液相色谱仪上,选用 C18 制备柱(25 mm×100 mm,15 μm,300i)进行反相高效液相制备色谱。流动相组成为:A 液,1 g/L 三氟乙酸/H₂O;B 液,1 g/L 三氟乙酸/乙腈。梯度设置为:A 液,100% 50%,间隔 15%;B 液,0 60%,间隔 15%,时间 30 min,流速为 1 mL/min。第一次进样量约 2 mL 样品,486 检测器检测 280 nm 吸收值,并分段收集,注意主峰出现的位置、峰形,收集主峰析出液。将收集的样品溶液倒入另一干净蒸馏瓶中,40 ℃ 恒温低压旋转蒸发,直至剩余约 5 mL 时停止蒸发,吸出剩余液体。倒入小烧杯中,盖上滤纸,放入冷冻干燥机中冷冻干燥过夜,最后获得的白色冻干粉即为 8 分支 MAP 肽。

1.4.5 MAP 肽质量鉴定 取少量最后获得的 8 分支 MAP 肽,再进行 HPLC 检测其纯度,并通过激光电子飞行质谱仪(MALDI-ToF)测定其相对分子质量。

1.5 合成 8 分支 MAP A₁₋₁₅ 的免疫原性检测

1.5.1 免疫方法 以合成的 8 分支 MAP A₁₋₁₅ 作为免疫原,采用 MF59 为免疫佐剂,以 PBS 溶解稀释 MAP 为 2 mg/mL,与 MF59 佐剂按 1:1 体积混合并完全乳化,每只动物每次接种剂量为 100 μL (含 100 μg MAP)。采用腋窝、腹股沟、背部皮下多点注射进行免疫接种,首次接种后 2 周进行加强免疫,其后间隔 1 个月接种 1 次。对照组接种方式与实验组相同,只是不加 MAP 抗原,而以相同体积 PBS 与 MF59 配制进行接种。

1.5.2 标本采集与分离 每次免疫接种后 2 周,断尾取血,每次约 0.2 mL,分离血清,并冻存于-20 ℃ 冰箱,备测抗体。

1.5.3 ELISA 检测抗体 采用标准间接 ELISA 法测定血清中抗体滴度。按照 400 ng/孔的最佳包被浓度包被 96 孔聚苯乙烯反应板,每孔 50 μL,37 ℃ 过夜;PBST 洗板 3 次,每次 3 min;加入 5 g/L 明胶液 37 ℃ 封闭 1 h,洗涤;加入倍比稀释的血清,每孔 50 μL,37 ℃ 孵育 2 h,洗涤。加酶标记山羊抗小鼠 IgG 50 μL,37 ℃ 孵育 2 h,洗涤;加入 OPD-H₂O₂ 底物,37 ℃ 反应 30 min,终止反应。酶联仪上于 492 nm 测定吸光度值,以 P/N > 2.1 为阳性,以最高稀释倍数的倒数作为样本的抗体滴度。

2 结果

2.1 RP-HPLC 色谱分析

以粗品确定出合适的 HPLC 色谱分析条件,并收集主峰(Peak 3),对合成的 MAP A₁₋₁₅ 进行纯化。在相同的色谱条件下,对纯化的 MAP A₁₋₁₅ 再进行 HPLC 分析,显示具有相同的保留时间,并且峰形基本单一,但主峰之后仍有一小峰。见图 2。

2.2 质谱检测分析

以纯化所得的 MAP 肽上样,进行质谱测定相对分子质量。结果显示在 12 000 到 17 000 处有一较宽大的离子峰,为质子化分子离子峰 [M+H]⁺,峰值为 15 458,与 MAP A₁₋₁₅ 理论相对分子质量 15 451 非常接近。并且质谱检测显示在 7 700 左右处也有一分子离子峰,其相对分子质量接近于 15 458 的一半,此峰即为双电荷单体分子离子峰 [M+2H]²⁺,且前一个波形与第二个波形极为相似。

2.3 抗体滴度检测

实验组第 1 次接种后采血检测,尚无抗 A 抗体产生;第 2 次接种后,血清中抗 A 抗体开始增

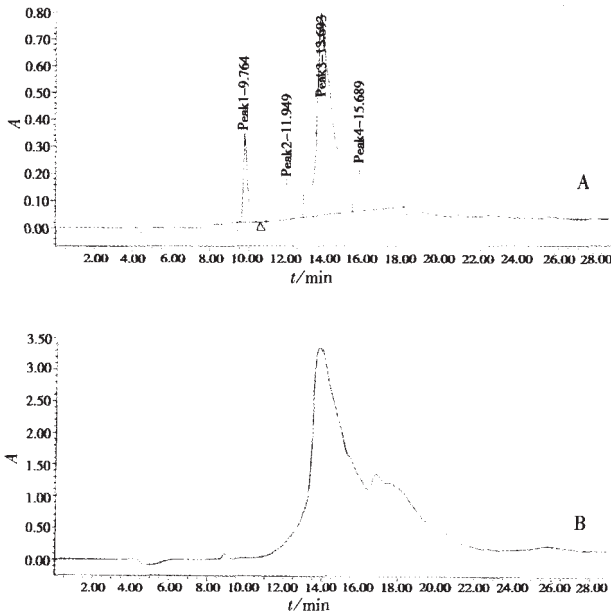


图 2 高效反相液相色谱分析合成的 MAP A₁₋₁₅ 的纯度
Fig.2 RP- HPLC purity analysis synthesized MAP A₁₋₁₅
A. preparation graph; B. purification graph

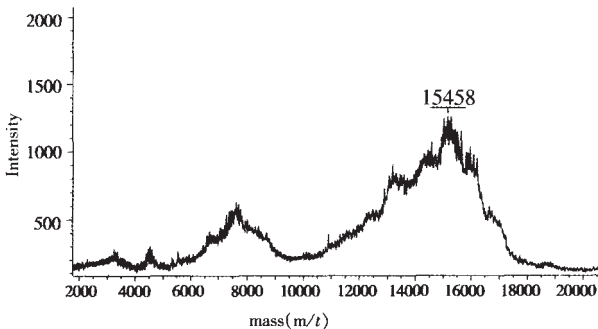


图 3 合成的 MAP A₁₋₁₅ 飞行质谱检测图
Fig.3 Detection of Mr of synthesized MAP A₁₋₁₅ by
MALDI- ToF MS

高;第 3 次接种后明显产生抗体,抗体滴度最高有 1 800,平均滴度为 $1\ 467 \pm 196$ 。随着接种次数的增多,抗体滴度不断增加,第 5 次免疫接种后,最高滴度为 1 6400,平均滴度为 $1\ 4367 \pm 120$ 。对照组的血清抗体检测基本无明显变化,实验组抗体滴度与对照组有明显差异 ($P < 0.01$)。两组动物抗体变化趋势见图 4。

3 讨论

由于小分子短肽作抗原由于其相对分子质量

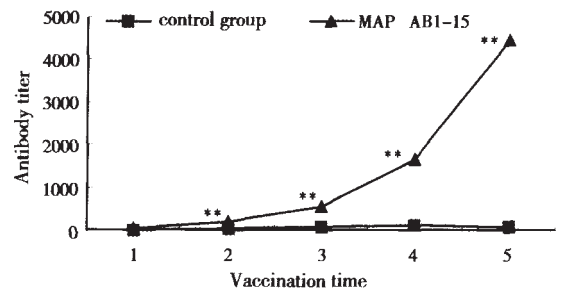


图 4 C57BL/6 小鼠免疫 MAP A₁₋₁₅ 后血清抗 A 抗体的滴度变化

Fig.4 Change tendency of anti - A antibody titer of serum in C57BL/6 mouse after MAP A₁₋₁₅ immunized

** Compared with control, $P < 0.01$

小,在体内容易降解,因而其免疫原性较低。既往在解决这个问题的时候多采用交联载体蛋白的方法来提高免疫原性,但载体蛋白本身如 BSA、KLH 等又具有很强的免疫原性,与肽交联后免疫动物产生的抗体大多数是针对载体蛋白的,并且这些抗体在人类身上可能产生有不良反应。而 MAP 则能很好地解决这些问题^[9],我们采用寡聚赖氨酸作为 MAP 核心结构,一个赖氨酸具有两个氨基端,因此连续连接了三级结构的七聚赖氨酸就有 8 个连接 A₁₋₁₅ 短肽的氨基端分支,而七聚赖氨酸核心结构本身没有抗原性,不会产生其他抗体,并且七聚赖氨酸分子小,呈树枝状,位于 8 分支 MAP 肽的核心内,不会掩盖或封闭 A₁₋₁₅ 的抗原表位。A₁₋₁₅ 的相对分子质量是 1 825.9,免疫原性差,通过引入多重抗原肽系统(multiple antigenic peptide system, MAPs)即连接了七聚赖氨酸的 8 分支 MAP A₁₋₁₅ 相对分子质量则是 15 451,因此,根据现代小分子疫苗研究的观点^[10],MAP A₁₋₁₅ 具有更强的免疫原性。

自从 1963 年 Merrifield 成功发展了固相多肽合成(SPPS)后,经过不断完善和改进,目前具有 Boc(叔丁氧羟基)固相合成和 Fmoc(9-芴甲氧羟基)固相合成两种方法,Fmoc 法主要是采用 Fmoc 基团保护的氨基酸,先将第一个氨基酸的羧基连接到不溶性树脂上,随后将 Fmoc 基团脱去保护露出氨基端,将第二个预先活化的 Fmoc 保护氨基酸通过偶联反应与前一个氨基酸连接,然后溶液洗脱,照此方法依次将多肽序列的氨基酸连接到树脂上,最后将肽从树脂上裂解下来,得到需要的多肽。本实验采用 Fmoc 法直接合成 MAP A₁₋₁₅,先

在王树脂上合成 MAP 核心结构七聚赖氨酸,然后同时从七聚赖氨酸的 8 个氨基末端连接氨基酸,连接顺序是按照 A₁₋₁₅C 端到 N 端,因此最后形成的 MAP 肽中 A₁₋₁₅ 的 N 端是游离的,能很好模拟单片段 A₁₋₁₅ 的自然状态下的结构形式,更好地保存了它的免疫原性。

对合成 MAP 肽,以往多只采用 HPLC 鉴定其纯度^[11],而在 MALDI-ToF 发明以后,由于其能方便地检测大分子量物质,因此质谱检测分子量也成为另一鉴定合成肽的重要手段^[12]。本实验对 HPLC 纯化获得的 MAP 肽进行质谱分析,主峰峰值是 15 458,与 MAP 理论相对分子质量很接近,但离子峰半峰宽度很大,接近 5 000,这说明实验最后获得的肽并不是一种单一化合物,而是相对分子质量在 12 000 到 17 000 的多种 MAP 肽的混合物。分析原因可能是,合成过程是从 C 末端开始一个一个的往 MAP 分支上连接,肯定有一些残缺的现象发生。而且由于随机发生的理论,这样的残缺肽的数目和种类都无法确定,并且由于是在 8 个分支上同时连接,所以其残缺肽的量是合成单片段 A₁₋₁₅ 时出现残缺肽的 8 倍。普通高效反相液相色谱对相对分子质量小于 10 000,尤其是 5 000 以下小分子肽的分离纯化效果较好^[13]。由于 MAP 相对分子质量本身比较大,对这种相差几十个氨基酸的 MAP 肽很难完全得到分离纯化,因此实验中进行 RP-HPLC 时,尽管纯化过程中收集的是主峰,但仍没能把这种相对分子质量相差较少的 MAP 肽区分开来。这也说明,对合成多肽尤其是 MAP 肽,最好的鉴定方法还是质谱检测。其次,由于单一 MAP 分子呈树枝状,但多个 MAP 分子混合后,可能部分分子相互交织在一起形成网状,在进行飞行质谱检测时,就会影响激光解吸电离,交织在一起的 MAP 分子就很难激发飞行,从而表现出较大跨度的主峰。

以合成的 MAP A₁₋₁₅ 与 MF59 混合组成 AD 疫苗,并对小鼠进行免疫,在首次免疫后的第 2 个月,即第 3 次免疫后,可检测到抗 A 抗体,但抗体滴度较低,再经过 3 次免疫,到第 4 个月时,抗体滴度明显升高,达到 1 4367,说明合成的 MAP A₁₋₁₅ 具有较好的免疫原性,可以有效激发动物机体的免疫反应,产生特异性抗体。因此,可以证明尽管以 Fmoc 直接法合成的 MAP A₁₋₁₅ 很难完全纯化,但本实验所合成得到的 MAP A₁₋₁₅ 具有很好的免疫活性,能够作为 AD 疫苗的有效成分,为以后市场化开发生产新型 AD 疫苗奠定了基础。

(感谢首都医科大学盛树力教授、姬志娟老师对实验的帮助)

参考文献:

- [1] SCHENK M, BARBOUR R, DUNN W, et al. Immunization with amyloid-beta attenuates Alzheimer-disease-like pathology in the PDAPP mouse [J]. *Nature*, 1999, 400(6740):173-177.
- [2] CHECK E. Nerve inflammation halts trial for Alzheimer's drug [J]. *Nature*, 2002, 415(6871):462-480.
- [3] NICOLL J A, WILKINSON D, HOLMES C, et al. Neuropathology of human Alzheimer disease after immunization with amyloid-beta peptide: a case report [J]. *Nat Med*, 2003, 9(4): 448-452.
- [4] 林贤,汪华侨,徐杰,等. A₄₂ 及其 C 端亚单位疫苗接种正常成年 SD 大鼠后产生高滴度的抗 A₄₂ 抗体[J]. *解剖学报*, 2003, 34(3):231-235.
- [5] 胡金家,汪华侨,李国营,等. 铝佐剂 A₄₂ 及其亚单位疫苗可有效诱导大鼠产生特异性抗体[J]. *中山大学学报:医学科学版*, 2004, 25(1):39-44.
- [6] LI SHAO-BING, WANG HUA-QIAO, LIN XIAN, et al. Specific humoral immune responses in adult rhesus monkeys vaccinated with A₁₋₁₅ vaccine [J]. *Chinese Medical Journal*, 2005, 118(8): 660-664.
- [7] 林贤,胡金家,汪华侨,等. A₄₂ 及其亚单位疫苗接种正常成年大鼠的行为学观察[J]. *中山大学学报:医学科学版*, 2004, 25(3):208-211.
- [8] 李国营,胡金家,林贤,等. A 不同片段肽疫苗免疫鼠后血清对 A₄₂ 诱导细胞毒性作用的影响[J]. *中山大学学报:医学科学版*, 2004, 25(2):102-104.
- [9] TAM J P. Recent advances in multiple antigen peptides [J]. *J Immunol Methods*, 1996, 196:17-32.
- [10] ERT C, XIANG Z. Novel vaccine approach [J]. *J Immunol*, 1996, 156(10):3579-3584.
- [11] BASAK A, BOUDREAULT A, CHEN A, et al. Application of the multiple antigenic peptides (MAP) strategy to the production of prohormone convertases antibodies: synthesis, characterization and use of 8-branched immunogenic peptides [J]. *J Pept Sci*, 1995, 1(6):385-395.
- [12] 周国华,罗国安,朱敏生. 基质辅助激光解吸质谱法在生物大分子质量研究中的应用[J]. *药学学报*, 1998, 33(4):290-295.
- [13] SANZ-NEBOT V, BENAVENTE F, TORO I, et al. Optimization of HPLC conditions for the separation of complex crude mixtures produced in the synthesis of therapeutic peptide hormones [J]. *Chromatographia*, 2001, 53(Suppl):167-169.

(编辑 张恩健)