

• 论 著 • DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2018.18.001

哮喘与感染患儿外周血中性粒细胞 CD64 指数、B 淋巴细胞、BTLA 的表达差异及临床意义研究^{*}

唐宗生¹, 许雪梅², 秦道建³, 李志鸿³, 陶明芬^{4△}

(1. 皖南医学院弋矶山医院输血科, 安徽芜湖 241001; 2. 上海交通大学医学院附属上海儿童医学中心 200127; 3. 皖南医学院弋矶山医院儿科, 安徽芜湖 241001; 4. 皖南医学院弋矶山医院血液净化中心, 安徽芜湖 241001)

摘 要:目的 研究哮喘与细菌感染患儿外周血中性粒细胞 CD64 指数、B 淋巴细胞、B 和 T 淋巴细胞衰减因子(BTLA)的表达差异及其作用机制。方法 选取皖南医学院弋矶山医院儿科 2015 年 6 月至 2017 年 1 月收住入院的 49 例患儿, 其中 3~6 岁哮喘患儿 26 例(哮喘组), 同期一般细菌感染患儿为 23 例(感染组)。两组受试对象在性别、年龄及体质量上差异均无统计学意义($P>0.05$)。住院后 24 h 内收集两组清晨空腹外周静脉血, 应用流式细胞术检测外周血中性粒细胞 CD64 指数和 B 淋巴细胞水平及其 BTLA 表达水平, 散射比浊法测定血清 IgE 水平, 免疫透射比浊法测定血清 CRP 水平。结果 哮喘组外周血中性粒细胞 CD64 水平高于感染组($P<0.05$)。哮喘组 B 淋巴细胞百分比高于感染组($P<0.05$); 哮喘组 B 淋巴细胞表面 BTLA 表达较感染组减少($P<0.01$); 哮喘组 B 淋巴细胞百分比与其表达 BTLA 成正相关($r=0.5698, P<0.01$)。哮喘组外周血清 CRP 水平较感染组低($P<0.05$)。哮喘组外周血清 IgE 水平较感染组显著升高($P<0.01$)。结论 感染是哮喘的诱发因素之一, CD64、CRP 的早期检测可指导哮喘患儿抗菌药物的应用。BTLA 在哮喘患儿 B 淋巴细胞表达下调, 参与免疫应答的调控。

关键词:中性粒细胞; CD64; B 淋巴细胞; B 和 T 淋巴细胞衰减因子; 哮喘; 细菌感染; 儿童

中图分类号: R720.5

文献标志码: A

文章编号: 1672-9455(2018)18-2685-05

The expression differences and the clinical significance of CD64 on neutrophils and BTLA on B lymphocyte in peripheral blood in children between with asthma and with infection^{*}

TANG Zongsheng¹, XU Xuemei², QIN Daojian³, LI Zhihong³, TAO Mingfen^{4△}

(1. Department of Blood Transfusion, Yijishan Hospital, Wannan Medical College, Wuhu, Anhui 241001, China; 2. The Affiliated Shanghai Children's Medical Center of Shanghai Jiaotong University School of Medicine, Shanghai 200127, China; 3. Department of Pediatrics, Yijishan Hospital, Wannan Medical College, Wuhu, Anhui 241001, China;

4. Hemopurification Center, Yijishan Hospital, Wannan Medical College, Wuhu, Anhui 241001, China)

Abstract: Objective To study the differential expression of CD64 on neutrophils and BTLA on B lymphocyte in peripheral blood in children with asthma or bacterial infection, which to explore its mechanism and clinical significance. **Methods** Children from 3 to 6 years old who were hospitalized at the First Affiliated Hospital of Wannan Medical College were selected as the study subjects from June 2015 to January 2017. In asthma group, there were 26 cases was diagnosed according to the eighth edition of Chu Fu Practical Pediatrics of children; and in the general bacterial infection group, there were 23 cases with infection index anomaly. There were little significant discrepancies in weight between the general bacterial infection group and the asthma group ($P>0.05$), also age and gender. There were no other complications in these children. Children with asthma and general bacterial infection were not treated prior to admission. The fasting peripheral venous blood was collected within 24 hours after hospitalization. Flow cytometry was used to test neutrophil CD64 index, the percentage of B lymphocytes and the expression of BTLA on B lymphocytes. IgE was tested by turbidimetry. And CRP was detected by immunoturbidimetry. **Results** The serum neutrophils CD64 in the asthma group was higher than that in the infection group ($P<0.05$). B lymphocytes percentage in the asthma group was higher than the infection group ($P<0.05$); the expression of BTLA on B lymphocyte in the asthma group was lower than that in the infection group ($P<0.01$); and the correlation between B lymphocyte and its BTLA

* 基金项目: 安徽省自然科学基金资助项目(1608085MH217)。

作者简介: 唐宗生, 男, 副主任技师, 主要从事临床免疫和输血相关方面的研究。△ 通信作者, E-mail: 947740079@qq.com。

was positive($r=0.569\ 8, P<0.01$). The level of serum CRP in the asthma group was lower than that in the infection group ($P<0.05$). The level of serum IgE in the asthmatic group was significantly higher than that in the infection group ($P<0.01$). **Conclusion** One of the high risk factors of asthma is bacterial infection. Early detection of CD64 and CRP can guide the application of antibiotics in children with asthma. The expression of BTLA on B lymphocyte in children with asthma was down-regulated and involved in the regulation of immune response.

Key words: neutrophil; CD64; B lymphocyte; BTLA; asthma; bacterial infection; children

据估计,到 2025 年全世界哮喘患者的数量将由目前的 3 亿多增至 4 亿^[1-2]。数量庞大,增长之势迅猛。儿童作为哮喘发病率较高的群体,其患病情况一直备受关注。哮喘的病理机制是气道慢性炎症,主要是气道的高反应性、阻塞可逆性和可重塑性,表现为反复咳嗽、气促、胸闷、肺部哮鸣音等^[3]。影响哮喘发病的因素众多,总的来说,由遗传因素和环境因素共同作用决定。临床上发现哮喘患者通常合并有感染,感染可能作为哮喘发病的一个重要诱因,并且可能加重哮喘患者病情,影响患者生活质量,增加医疗费用。本研究以哮喘和一般细菌感染患儿作为研究对象,通过测定两组外周血中性粒细胞 CD64、B 淋巴细胞、B 和 T 淋巴细胞衰竭因子(BTLA)、免疫球蛋白 E(IgE)、C 反应蛋白(CRP)水平,探讨其作用机制及临床意义。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取皖南医学院弋矶山医院儿科 2015 年 6 月至 2017 年 1 月收住入院的 49 例患儿,其中哮喘组 26 例(女 14 例,男 12 例),同期一般细菌感染组 23 例(女 10 例,男 13 例)。两组受试对象在年龄、体质量、性别方面差异无统计学意义($P>0.05$)。两组患儿均无其他并发症。哮喘患儿及一般感染患儿入院前均未接受治疗。本研究获得家属知情同意。哮喘组患儿均符合哮喘诊断标准(第 8 版《诸福棠实用儿科学》):(1)反复发作喘息、胸闷、气促,多与接触变应原、化学、物理性刺激等有关,常在夜间和(或)清晨发作或加剧。(2)在发作时两肺可闻及以呼气相为主的散在或弥漫性哮鸣音,呼气相延长。(3)上述症状和体征经抗哮喘治疗有效或自行缓解。(4)除外其他疾病所引发的喘息、咳嗽、气促和胸闷。(5)临床表现不典型者,至少符合以下一项标准,①运动激发试验或支气管激发试验阳性。②证明有可逆性气流受限(满足以下任意一项),抗哮喘治疗有效,即使用支气管舒张剂和吸入(或口服)糖皮质激素治疗 1~2 周后,第 1 秒用力呼吸容积(FEV1)增长 $\geq 12\%$;支气管舒张试验阳性,即吸入速效 β_2 受体激动剂 15 min 后的 FEV1 增长 $\geq 12\%$ 。③最大呼气流量(PEF)连续检测 1~2 周,每日变异率 $\geq 20\%$ 。符合第 1~4 项或第 4、5 项者,可以诊断为哮喘。一般细菌感染诊断标准:中性粒细胞绝对值 $>10\times 10^9/L$ 或 CRP $>10\text{ mg/L}$ 或降钙素原(PCT) $>0.5\text{ ng/mL}$ 确证,并完善呼吸

道病毒、肺炎衣原体、肺炎支原体等检测,排除病毒及特殊病原体感染。

1.2 仪器与试剂 Mouse Anti-Human CD45-PE-CY5 溶液(Cat: 12-0649;美国 eBioscience 公司)、Mouse Anti-Human CD64-PE 溶液(Cat: 12-0649;美国 eBioscience 公司)、Mouse Anti-Human CD3-PE-CF594 溶液(Cat: 562280;美国 BD Bioscience 公司)、Mouse Anti-Human Anti-Human CD19-PE-CY5 溶液(Cat: A07771;美国 Beckman Coulter 公司)、Mouse Anti-human CD272-PE 溶液(BTLA)(Cat: 344506;美国 Biolegend 公司) OptiLyse C 红细胞裂解液(11895;美国 Beckman Coulter 公司);磷酸盐缓冲液(PBS, HyClone SH30256.01B;北京 Therm 公司)。FC500 MPL 流式细胞仪(美国 Beckman Coulter 公司)。

1.3 方法 患儿入院 24 h 内,在取得家属同意的前提下,采集清晨空腹外周静脉血送至相关化验室检测并报告结果;另外留取 1.5 mL 在乙二胺四乙酸(EDTA)抗凝管(紫头)中自行实验通过流式细胞仪测得。

取 EDTA 抗凝管中的全血 20 μL 依次置于分别标记 A、B 的流式管中;在暗光下依次向流式管中加入单克隆抗体染色剂各 1.5 μL (A 管: CD64-PE、CD45-PE-CY5, B 管: CD3-CF594、CD19-PE-CY5、CD272-PE),混匀避光 20 min 后分别加入 1 $\times$ 红细胞裂解液 1 500 μL ,再混匀避光 20 min 后以 1 500 r/min 离心 5 min,共 2 次;最后加 1 $\times$ PBS 700 μL 混匀,至此荧光抗体标记样本制备好,并用流式细胞仪检测;所得结果使用 FlowJo_V10 软件分析,计算中性粒细胞平均荧光强度和淋巴细胞平均荧光强度得出 CD64 指数,计算 B 淋巴细胞的百分比及其 BTLA 表达。

1.4 统计学处理 采用 GraphPad Prism 6 统计软件分析。Mann-Whitney test 检验比较两组中性粒细胞 CD64 指数、B 淋巴细胞百分比及其 BTLA 表达百分率和荧光强度、CRP 和 IgE 之间差异;Spearman 相关分析评价两个指标之间的相关性。计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 中性粒细胞指数变化 N 代表中性粒细胞平均荧光强度;L 代表淋巴细胞平均荧光强度,CD64 指数表示 N 的 MFI 与 L 的 MFI 比值。根据统计分析结

果可知,感染组和哮喘组中性粒细胞 CD64 指数比较, 差异有统计学意义($P<0.05$),见图 1。

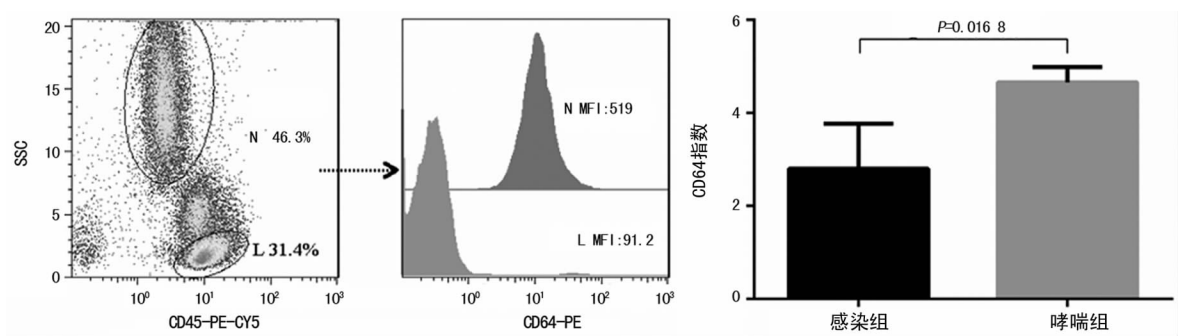


图 1 中性粒细胞 CD64 表达

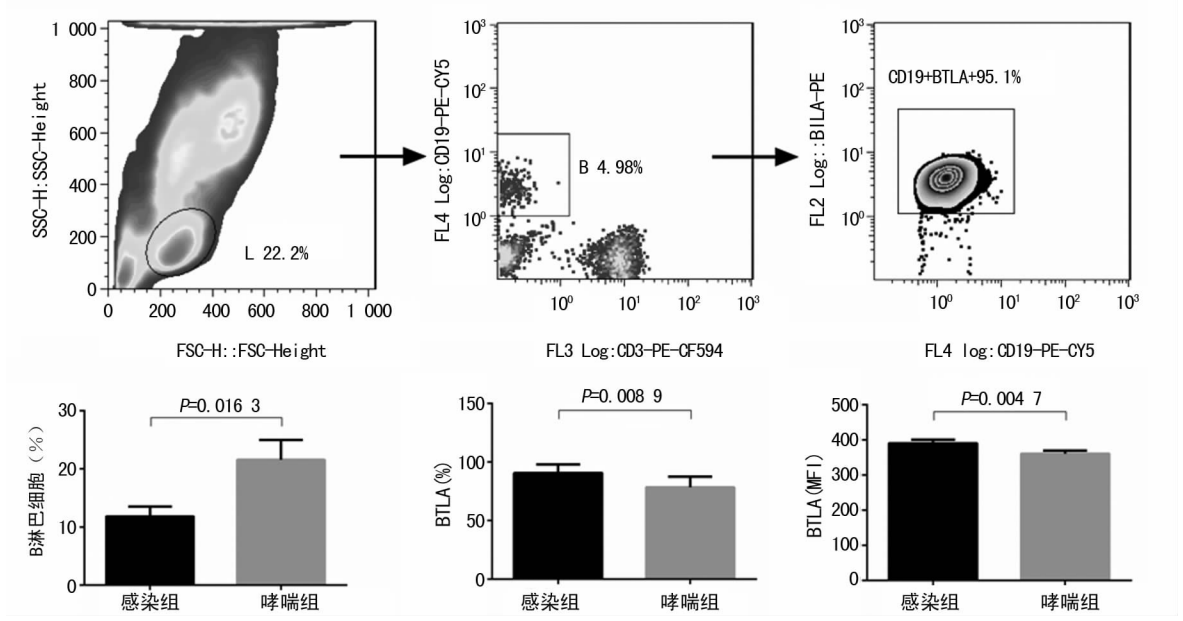


图 2 B 淋巴细胞百分率及 BTLA 表达

2.2 B 细胞的百分比及其 BTLA 的表达 根据统计分析结果可知,哮喘组 B 淋巴细胞百分比高于感染组,差异有统计学意义($P<0.05$);哮喘组 B 淋巴细胞表面 BTLA 表达(百分比及平均荧光强度)较感染组明显降低,差异有统计学意义($P<0.01$)。见图 2。

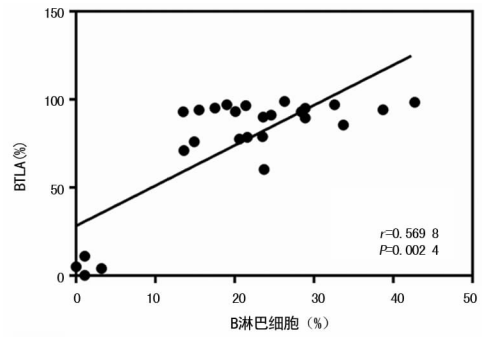


图 3 B 淋巴细胞与其表达 BTLA 相关性

2.3 B 细胞与其表达的 BTLA 相关性分析 根据统计分析结果可知,哮喘组 B 淋巴细胞百分比与其表达 BTLA 呈正相关($r=0.5698, P=0.0024<0.01$),见图 3。

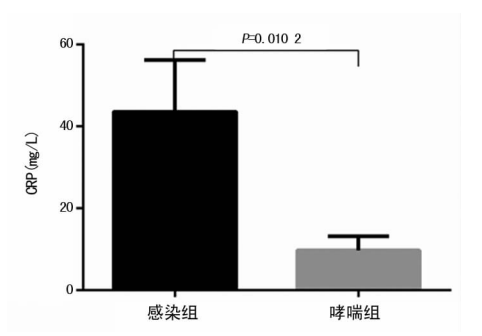


图 4 血清 CRP 水平

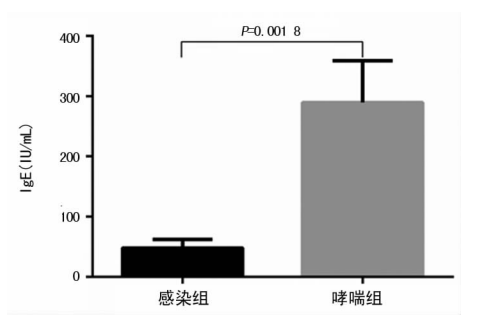


图 5 血清 IgE 水平

2.4 外周血清 CRP 与 IgE 分析 根据统计分析结果可知,哮喘组血清 CRP 水平较感染组低,差异有统计学意义($P<0.05$),见图 4;感染组血清 IgE 水平较哮喘组有显著减低,差异有统计学意义($P<0.01$),见图 5。

3 讨 论

儿童哮喘的发生并无特定、明确的病因,该病是由遗传因素与环境因素共同导致。对于多数哮喘患儿,追寻病史可发现其三代近亲属中有人罹患哮喘。除哮喘外,还可以发现患儿家族近亲中有过敏性鼻炎、荨麻疹、湿疹等患者。且该病具有多基因遗传倾向,并非独立发病,感染、尘螨、空气污染、花粉过敏、食物过敏、运动、情绪变化等均可引发哮喘。越来越多的研究证明,病毒、细菌及定植菌在哮喘的发病过程中发挥了一定的作用,它们可能作为独立影响因素,或者病毒的辅因子^[4-7]。BISGAARD 等^[6]通过大的出生队列研究发现哮喘母亲分娩的无症状新生儿在生后 5 年内发生哮喘与其咽部定植肺炎链球菌、流感嗜血杆菌、卡他莫拉菌呈正相关。对同一人群进行第二项研究,观察发生喘息性疾病时细菌和病毒在呼吸道出现的频率^[8]。他们发现,喘息与细菌感染(肺炎链球菌、流感嗜血杆菌、卡他莫拉菌)密切相关,这种关系与病毒感染相似但又有区别。本研究结果显示,感染组 CRP 高于哮喘组,哮喘患儿在急性发作期可合并有细菌感染,感染不是哮喘的独立发病因素,除外遗传背景,还可能与过敏、运动、情绪变化等有关。另外本研究显示,感染组 CD64 指数低于哮喘组,这与预期结果不符。中性粒细胞作为固有免疫的重要细胞,在细菌侵入机体后第一时间到达炎症部位,通过吞噬病原体、分泌抗菌物质发挥作用,同时分泌细胞因子募集单核巨噬细胞、树突状细胞等发挥免疫调节作用。国外学者认为 CRP 和 CD64 均可作为细菌感染的检测指标,CD64 在感染 12 h 内一般即有变化,而 CRP 出现变化较晚,一般超过 24 h^[9]。在正常情况时,中性粒细胞表面很少表达 CD64,而当机体感染细菌后,中性粒细胞表面的 CD64 表达明显增多。在一般细菌感染,固有免疫发挥重要作用。故预期结果与实验结果相反。哮喘被认为是一类变态反应性疾病,CD64 在哮喘患儿中性粒细胞表面的过度表达可能与机体粒细胞吞噬、活化反应降低有关^[10-11]。感染作为哮喘发病的危险因素,不仅加重已有的哮喘,而且促进哮喘的发生、发展,使其难以控制。所以,本研究认为在哮喘患者在有 CD64 或 CRP 指标异常情况下需积极抗感染治疗。另外,本课题组之前的研究显示,对于细菌感染联合检测 CD64 和 CRP 的灵敏度及准确度均较单一指标升高^[12]。

哮喘发病是多种因素相互作用的结果,免疫因素所致的气道慢性炎症被认为是哮喘的本质,除外固有免疫应答,适应性免疫应答也参与哮喘的发病。免疫

功能紊乱与哮喘的发生、发展密切相关。正常情况下,淋巴细胞亚群的比例在一定范围内。在适应性免疫应答中,T 细胞的完全活化需要 TCR-CD3 特异性识别 pMHC 产生的第一活化信号、T 细胞与 APC 表面的共刺激分子相互作用后产生第二活化信号及 Th 细胞上调表达相关细胞因子受体结合细胞因子产生的第三信号。B 细胞在适应性免疫应答中也起重要作用。对绝大部分 B 细胞来说,其活化需要 T 细胞辅助,完全活化需要先 B-T 结合提供第一信号、然后 B 细胞表面共刺激分子传递第二信号、最后 B 细胞表达细胞因子受体结合细胞因子传递第三信号。大部分 B 细胞活化后,转化为浆细胞,产生大量 IgE,IgE 的合成增多是儿童哮喘的主要免疫特性。本实验结果显示:哮喘组 B 淋巴细胞百分比及 IgE 水平较感染组明显升高,证实 B 淋巴细胞参与了哮喘的发病,并发挥了重要作用。故认为临床上检测 B 淋巴细胞及 IgE 水平有助于哮喘的诊治,可提早预防。

BTLA 是 CD28 家族抑制性受体成员之一,是表达在细胞膜表面的 1 型跨膜蛋白,包含一个免疫球蛋白超家族结构域,一个跨膜区和一个胞内域,后者包含一个近端免疫受体酪氨酸抑制基序(ITIM)和远端的免疫受体酪氨酸转换基序(ITSM)。BTLA 最初是从鼠 Th1 细胞中克隆而来。目前发现 BTLA 广泛表达于 B 淋巴细胞、T 淋巴细胞(CD4⁺ T 细胞/CD8⁺ T 细胞/调节性 T 细胞)、巨噬细胞、树突状细胞和 NK 细胞等。HVEM 是 BTLA 的唯一配体,为肿瘤坏死因子受体超家族的一个成员,与 BTLA 相互作用参与免疫耐受。BTLA 是 B 和 T 淋巴细胞的共抑制受体,在炎症和感染过程中调节淋巴细胞活化发挥重要作用。研究更多的是其在 T 淋巴细胞的作用。已知 BTLA 抑制小鼠和人类 T 细胞的活化和增殖。然而关于 BTLA 在 B 淋巴细胞中的作用和功能的研究甚少。VENDEL 等^[13]研究了 B 细胞 BTLA 的抑制作用。BTLA 与 HVEM 结合后抑制 B 细胞的增殖,主要是通过减少脾酪氨酸激酶(SYK)、B 细胞连接蛋白和磷脂酶 C- $\gamma 2$ 的磷酸化下调 BCR 下游信号分子的信号强度发挥作用。THIBULT 等^[14]认为,BTLA/HVEM 信号通路可以通过抑制 CG 二核苷酸来抑制 B 细胞的功能。动物实验显示特异性抗体反应和自身免疫性肝炎与 BTLA 缺乏有关,突出 BTLA 在调节 B 细胞的自身免疫性方面的潜在作用。有数据显示缺乏 BTLA 能够促进受细菌感染诱导的抗原特异性 CD8⁺ T 细胞的存活,再次表明 BTLA 可能在维持免疫系统的平衡方面起作用。虽然 BTLA 被普遍看作是一个共抑制受体,但是有报告认为这可能取决于抗原刺激的强度。研究显示,免疫衰老时 B 淋巴细胞表达 BTLA 减少,这可能与老年人长寿浆细胞、记忆 B 细胞和抗体效价诱导减低有关。由此推测 BTLA 可能促进而不是抑制长寿浆细胞和记忆 B 细胞的

诱导,当然这有待于进一步研究。本研究中哮喘组 BTLA 表达水平较感染组低。此外,B 淋巴细胞百分比与其 BTLA 的表达呈正相关。结合本研究中哮喘组 B 淋巴细胞表达较感染组多,笔者猜测可能处在不同分化阶段的 BTLA 表达水平不同。THIBULT 等^[14]研究表明,处在不同阶段的 B 淋巴细胞其 BTLA 的表达水平也有变化。虽然 BTLA 在所有 B 淋巴细胞亚群表达,但是在初始 B 淋巴细胞(CD19⁺ IgD⁺ CD27⁻)和记忆 B 淋巴细胞(CD19⁺ IgD⁻ CD27⁺)的表达明显低于 IgM 记忆 B 淋巴细胞(CD19⁺ IgD⁺ CD27⁺),循环过渡期 B 淋巴细胞(CD27⁻ IgD⁺ CD24^{high} 和 CD38^{high})表达更高。研究还分析了 HVEM 在 B 淋巴细胞分化亚群的表达;与 BTLA 相反,HVEM 的表达与 B 淋巴细胞所处分化阶段无关。研究还分析了 B 淋巴细胞活化时 BTLA 的变化情况。B 淋巴细胞表达基因编码的 TLAR(Toll 样受体),主要与先天性免疫有关,然后针对入侵的病原体发生适应性免疫应答。人体 TLR9 的表达则只存在于 B 淋巴细胞、浆细胞样树突状细胞。TLR9 识别低甲基化 CpG 基序(细菌、病毒和原生动物 DNA 的特征),后者与人工合成的寡聚核苷酸相似(如 CpG 基序)。研究中,接种含 CpG 佐剂疫苗的黑色素瘤患者循环 B 淋巴细胞持续表达 BTLA,而接种缺乏 CpG 佐剂疫苗的黑色素瘤患者循环中 B 淋巴细胞 BTLA 表达逐步下调。在 B 淋巴细胞分化过程中,BTLA 表达被调节,在 IgM 记忆 B 淋巴细胞 BTLA 表达升高。结合上述内容,虽然哮喘组 B 淋巴细胞百分比较感染组高,但 BTLA 表达较感染组低,笔者推测一方面与 B 淋巴细胞分化所处阶段有关,另一方面与细菌感染人体后其低甲基化 CpG 基序被 B 细胞表面 TLR9 识别,使 B 淋巴细胞持续表达 BTLA。

本研究的不足之处:因患儿年龄较小、入组标准严格、采集血液标本需征求家属知情同意,故最终入组对象数量相对较少,一定程度上可能影响试验结果,其样本代表性还需进一步的试验验证。

综上所述,笔者认为感染是哮喘发病的重要因素,临床上哮喘患者有感染应积极抗感染治疗。哮喘发病机制复杂,BTLA、B 淋巴细胞、IgE 等只是其众多研究中的一部分。哮喘发病众多因素相互影响、相互作用,构成了一个巨大的网络,需要更大样本量、更加系统、多中心的临床研究来阐释其中错综复杂的网络关系机制。

参考文献

[1] CROISANT S. Epidemiology of asthma: prevalence and burden of disease[J]. Adv Exp Med Biol, 2014(795):17-29.
[2] BOUSQUET J, KHALTAEV N, BOUSQUET J, et al.

Global surveillance, prevention and control of chronic respiratory diseases; a comprehensive approach[J]. JPT, 2008, 24(2):122.
[3] KEGLOWICH L F, BORGER P. The three a's in asthma-airway smooth muscle, airway remodeling & angiogenesis[J]. Open Respir Med J, 2015, 9(1):70-80.
[4] THOMAS A O, LEMANSKE R F, JACKSON D J. Infections and their role in childhood asthma inception[J]. Pediatr Allergy Immunol, 2014, 25(2):122-128.
[5] MACKENZIE K J, ANDERTON S M, SCHWARZE J. Viral respiratory tract infections and asthma in early Life; cause and effect? [J]. Clin Exper Allergy, 2014, 44(1):9-19.
[6] BISGAARD H, HERMANSEN M N, BUCHVALD F, et al. Childhood asthma after bacterial colonization of the airway in neonates[J]. N Engl J Med, 2007, 357(15):1487-1495.
[7] KLOEPFER K M, LEE W M, PAPPAS T E, et al. Detection of pathogenic bacteria during rhinovirus infection is associated with increased respiratory symptoms and asthma exacerbations[J]. J Allergy Clin Immunol, 2014, 133(5):1301-1307.
[8] BISGAARD H, HERMANSEN M N, BØNNELYKKE K, et al. Association of bacteria and viruses with wheezy episodes in young children; prospective birth cohort study [J]. BMJ, 2010, 341(7776):c4978.
[9] BHANDARI V. Effective biomarkers for diagnosis of neonatal sepsis[J]. J Pediatric Infect Dis Soc, 2014, 3(3):234-245.
[10] SPARK J I, SCOTT D J. Role of the neutrophil in the development of systemic inflammatory response syndrome and sepsis following abdominal aortic surgery[J]. Br J Surg, 2001, 88(12):1583-1589.
[11] HIRSH M, MAHAMID E, BASHENKO Y, et al. Overexpression of the high-affinity Fcγ receptor (CD64) is associated with leukocyte dysfunction in sepsis [J]. Shock, 2001, 16(2):102-108.
[12] 秦道建, 唐宗生, 陈淑丽, 等. 中性粒细胞 CD64 和降钙素原联合检测在新生儿细菌感染早期诊断中的价值[J]. 中国当代儿科杂志, 2017, 19(8):872-876.
[13] VENDEL A C, CALEMINI-FENAUX J, IZRAEL-TO-MASEVIC A, et al. B and T lymphocyte attenuator regulates B cell receptor signaling by targeting syk and BLNK [J]. J Immunol, 2009, 182(3):1509-1517.
[14] THIBULT M L, RIVALS J P, MAMESSIER E, et al. CpG-ODN-induced sustained expression of BTLA mediating selective inhibition of human B cells[J]. J Mol Med (Berl), 2013, 91(2):195-205.

(收稿日期:2018-02-04 修回日期:2018-04-20)