论著

文章编号:1000-5404(2014)04-0364-05

人端粒酶逆转录酶启动子转录活性的磁共振成像研究

杨 燕,张 冬,龚明福,杨 华,张 松,邹利光 (400037 重庆,第三军医大学新桥医院放射科)

[摘要] **目的** 探索磁共振成像技术检测人端粒酶逆转录酶(human telomerase reverse transcriptase,hTERT)启动子靶向转录活性的可行性。**方法** 构建慢病毒 Lenti-hTERT-Fth-flag-Puro 和对照 Lenti-CMV-Fth-flag-Puro 载体,将上述载体分别转染端粒酶阳性的肺腺癌(A549)和端粒酶阴性的原代人牙周膜成纤维(human periodontal ligament fibroblasts,HPDLFs)细胞。进行免疫荧光染色和 Western blot 检测细胞 Fth-flag 表达情况,采用普鲁氏蓝铁染色检测细胞摄铁量,MR 扫描观察细胞 T_2^* WI 信号和 T_2^* 值改变。**结果** A549 细胞转染 Lenti-hTERT-Fth-flag-Puro 载体后,免疫荧光染色和 Western blot 检测结果显示转染细胞表达 Fth-flag 蛋白,未转染细胞不表达 Fth-flag 蛋白,普鲁氏蓝铁染色示转染细胞摄铁量较未转染细胞显著增加,MR 扫描显示转染细胞 T_2^* WI 信号(1 340.86 ± 49.21)和 T_2^* 值(12.10 ± 0.92)较未转染细胞(2 049.08 ± 87.58),(21.44 ± 1.15)显著降低($P<0.05$);HPDLFs 细胞转染 Lenti-hTERT-Fth-flag-Puro 载体后,细胞无 Fth-flag 蛋白表达,细胞摄铁量较未转染细胞无变化,T_2^* WI 信号(2 225.42 ± 73.43)和 T_2^* 值(24.01 ± 1.13)较未转染细胞 T_2^* WI 信号(2 148.48 ± 54.74)和 T_2^* 值(23.39 ± 1.72)无显著差异($P>0.05$)。而转染对照 Lenti-CMV-Fth-flag-Puro 慢病毒载体后,A549 和 HPDLFs 细胞均表达 Fth-flag 蛋白,转染细胞摄铁量较未转染细胞均显著增加,转染细胞 T_2^* WI 信号[A549:(1 137.38 ± 60.59),HPDLFs:(1 299.16 ± 53.42)]和 T_2^* 值[A549:(9.61 ± 1.17),HPDLFs:(11.54 ± 0.74)]均比未转染细胞显著下降($P<0.05$)。**结论** MR 铁蛋白报告基因成像技术可用于检测 hTERT 启动子转录活性,构建的慢病毒载体有望为恶性肿瘤的靶向诊断提供一种新的方法。

[关键词] 磁共振成像;人端粒酶逆转录酶启动子;铁蛋白;报告基因
[中图法分类号] R394-33;R394.3;R445.2 [文献标志码] A

Detection of transcriptional activity of hTERT promoter with MR imaging

Yang Yan, Zhang Dong, Gong Mingfu, Yang Hua, Zhang Song, Zou Liguang (Department of Radiology, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400037, China)

[**Abstract**] **Objective** To explore the possibility of detecting the transcriptional activity of human telomerase reverse transcriptase (hTERT) promoter with MR imaging (MRI). **Methods** The Lenti-hTERT-Fth-flag-Puro vector was constructed and transfected into telomerase-positive human lung carcinoma A549 cells and telomerase-negative primary human periodontal ligament fibroblasts (HPDLFs), with Lenti-CMV-Fth-flag-Puro vector used as control. Immunofluorescent staining and Western blotting were used to detect Fth-flag protein expression. Prussian blue iron staining was used for assaying iron accumulation. MRI was performed to determine the changes of T_2^* WI signal intensity and T_2^* value of cells *in vitro*. **Results** After transfected with Lenti-hTERT-Fth-flag-Puro vector, Fth-flag protein overexpression and iron accumulation increase were observed in transfected A549 cells but not in untransfected cells. MRI showed that the T_2^* WI signal intensity and T_2^* value of transfected A549 cells (SI: 1 340.86 ± 49.21, T_2^* value: 12.10 ± 0.92) were significantly decreased as compared to untransfected A549 cells (SI: 2 049.08 ± 87.58, T_2^* value: 21.44 ± 1.15) ($P<0.05$). However, Fth-flag protein overexpression and iron accumulation increase were not observed in HPDLFs cells after transfected with Lenti-hTERT-Fth-flag-Puro vector. Accordingly, no significant difference of the T_2^* WI signal intensity and T_2^* value were observed between transfected HPDLFs cells (SI: 2 225.42 ± 73.43, T_2^* value: 24.01 ± 1.13) and untransfected HPDLFs cells (SI: 2 148.48 ± 54.74, T_2^* value: 23.39 ± 1.72) ($P>0.05$). While transfected with Lenti-CMV-Fth-flag-Puro vector, A549 and HPDLFs cells both showed Fth-flag protein

[基金项目] 重庆市基础与前沿研究计划重点项目(CSTC2013jjB10010)
[通信作者] 张 冬,电话:(023)68755315,E-mail:hszhangd@163.com
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20131121.1718.008.html(2013-11-21)

overexpression and iron accumulation increase, and the T_2^* WI signal intensity and T_2^* value of transfected cells (A549: 1 137.38 ± 60.59, 9.61 ± 1.17; HPDLFs: 1 299.16 ± 53.42, 11.54 ± 0.74) were both significantly decreased as compared to untransfected ones ($P < 0.05$). **Conclusion** It is achievable to detect transcriptional activity of hTERT promoter using MRI technology. The reporter gene imaging system used in this study may become a new prognostic method for cancer.

[**Key words**] magnetic resonance imaging; human telomerase reverse transcriptase promoter; ferritin; reporter gene

Supported by the Key Project of Basic and Cutting-edge Research Program of Chongqing (CSTC2013jjB10010). Corresponding author: Zhang Dong, Tel: 86-23-68755315, E-mail: hszhangd@163.com

研究表明人端粒酶逆转录酶(human telomerase reverse transcriptase,hTERT)启动子在绝大多数(85%以上)恶性肿瘤细胞中均能启动 hTERT 基因的表达,是目前已知最广谱的恶性肿瘤特异性启动子[1-3]。基于 hTERT 启动子的这一特性,不少国内外研究者应用 hTERT 启动子驱动抗癌基因靶向性表达于恶性肿瘤细胞内并达到破坏肿瘤细胞的目的[4-5],然而,启动子调控基因靶向表达的情况及其产生的效应主要是通过获取标本进行染色、蛋白印迹、PCR 等侵入性方法进行评价。因此,对 hTERT 启动子的靶向转录活性进行非侵入性监测具有重要的肿瘤学意义。

目前,已有研究者应用放射性核素和光学报告基因成像技术,对 hTERT 启动子的靶向转录活性进行了在体非侵入性检测、显像[6-7];然而,尚少有报道探索 MR 成像技术在该方面的可行性及肿瘤学意义。铁蛋白是机体主要的储铁蛋白,将摄取的铁离子聚集在蛋白壳内形成具有超顺磁性的氧化铁颗粒,可显著缩短横向弛豫时间改变 MR 信号强度,无需引入外源性对比剂即可实现 MR 成像[8-9]。本研究应用 hTERT 启动子调控铁蛋白基因表达的慢病毒载体转染细胞,进行 MR 扫描,探索 MR 成像技术检测 hTERT 启动子靶向转录活性的可行性。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞株 人肺腺癌(A549)和原代培养人牙周膜成纤维(human periodontal ligament fibroblasts,HPDLFs)细胞由新桥医院中心实验室提供。

1.1.2 慢病毒载体 人工合成 flag 标记的铁蛋白重链(Fth,GenBank NM_010239)基因序列(Fth-flag),克隆入慢病毒表达载体 pCDH-CMV-MCS-Puro 的酶切位点 *Nhe* Ⅰ和 *Bam*HⅠ之间,构建 pCDH-CMV-Fth-flag-Puro 表达载体。用 *Spe* Ⅰ和 *Xba* Ⅰ对该表达载体进行酶切,电泳回收无 CMV 启动子的线性载体片段。从含 hTERT 启动子的质粒中 PCR 扩增 hTERT 启动子片段重组入回收的载体片段构建 pCDH-hTERT-Fth-flag-Puro 表达载体。测序无误并检测目的基因 Fth-flag 能表达后,进行慢病毒包装。慢病毒包装采用 pCD/NL-BH * DDD 和 pLTR-G 包装质粒,293T 包装细胞,将构建的慢病毒表达载体分别命名为 Lenti-hTERT-Fth-flag-Puro 和 Lenti-CMV-Fth-flag-Puro。

1.1.3 实验主要试剂 细胞培养主要试剂:高糖 DMEM 培养基(Gibco)、胎牛血清(Gibco)、枸橼酸铁(Sigma)。抗体:兔抗人 hTERT 单克隆一抗(Abcam)、鼠抗 flag 单克隆一抗(Sigma)、抗兔 Alexa Fluor 488 和抗鼠 Alexa Fluor 555 荧光二抗(碧云天),鼠抗 β-actin 单克隆一抗(Santa Cruz),HRP 标记的羊抗兔 Ig 和羊抗鼠 Ig(Santa Cruz)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养及转染 细胞用含 10% 胎牛血清、100 U/mL 青霉素和 100 mg/mL 链霉素的高糖 DMEM 培养基培养,培养条件为 37 ℃,5% CO_2。分别应用 Lenti-hTERT-Fth-flag-Puro 和 Lenti-CMV-Fth-flag-Puro 慢病毒载体转染 A549 和 HPDLFs 细胞,应用嘌呤霉素(3 μg/mL)筛选稳定转染株(转染 Lenti-hTERT-Fth-flag-Puro 载体的 HPDLFs 细胞除外)。

1.2.2 免疫荧光染色 细胞接种于共聚焦培养皿内,2 d 后进行免疫荧光染色。细胞用 4% 多聚甲醛固定 10 min,0.5% Triton X-100 孵育 5 min,10% 羊血清封闭 20 min,加入 hTERT(1∶100)或 flag(1∶500)一抗 4 ℃孵育过夜,荧光二抗室温避光孵育 60 min,DAPI 复染核 3 min。

1.2.3 Western blot 检测 应用 RAPI 裂解液(Sigma)裂解细胞,离心收集上清蛋白,BCA 法测定蛋白浓度。蛋白变性后经 SDS-PAGE 电泳后转移至 PVDF 膜,膜用 5% BSA 封闭 2 h,β-actin 一抗(1∶1 000)、hTERT(1∶1 000)或 flag(1∶1 000)一抗 4 ℃孵育过夜,二抗室温孵育 2 h,最后用 ECL 化学发光试剂显像。

1.2.4 普鲁氏蓝铁染色 细胞用含枸橼酸铁铵(FAC,1 mmol/L)的培养基培养 48 h,PBS 充分漂洗,4% 多聚甲醛固定 10 min,普鲁氏蓝铁染色试剂(2% 亚铁氰化钾和 2% HCl 等体积混合)室温孵育 30 min,中性红染核 30 s,蒸馏水冲洗,封片。

1.2.5 MRI 细胞用含 FAC(1 mmol/L)的培养基培养 48 h 后,用 PBS 充分清洗细胞以除去游离铁离子。胰酶消化后离心收集细胞(约 2×10^7 个),4% 多聚甲醛固定 10 min。在 2 mL 离心管内预铺垫 500 μL 1% 琼脂糖,待其冷却后,将细胞用 1 mL PBS 重悬后加入离心管内,待细胞自然下沉至琼脂糖面上后行 3.0T 磁共振扫描(GE),扫描参数:梯度自旋回波(GRE)T_2^* WI:TR = 400 ms,TE = 12.0 ms,成像视野(FOV)为 24 mm × 24 mm,层厚 1 mm,层间距 0.1 mm;T_2^* MAP:TR = 1 000 ms,TE = (2.5、6.0、9.5、13.0、16.5、20.0、23.5、27.0) ms,所得图像由软件自动生成 T_2^* 值伪彩图。每种细胞选取 5 个感兴趣区(ROI,面积 25 mm^2)测量 T_2^* WI 信号强度(SI)和 T_2^* 值。

1.3 统计学方法

应用SPSS 17.0软件对收集的数据进行统计学处理，结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示，同种细胞不同处理组（慢病毒Lenti-hTERT-Fth-flag-Puro载体转染组、慢病毒Lenti-CMV-Fth-flag-Puro载体转染组、未转染细胞组）之间 T_2^* WI信号强度（SI）和 T_2^* 值差异采用单因素方差分析。

2 结果

2.1 细胞hTERT表达检测

免疫荧光染色和Western blot实验证明hTERT蛋白在恶性肿瘤细胞A549中有表达，在正常细胞HPDLFs中无表达（图1、2）。

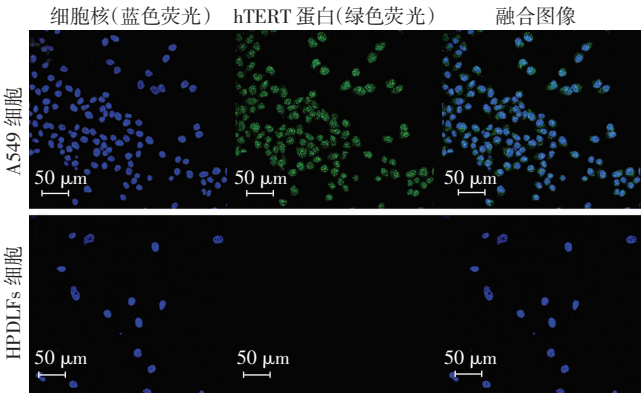
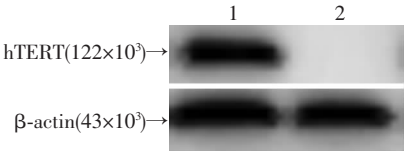


图1 免疫荧光观察细胞株hTERT表达

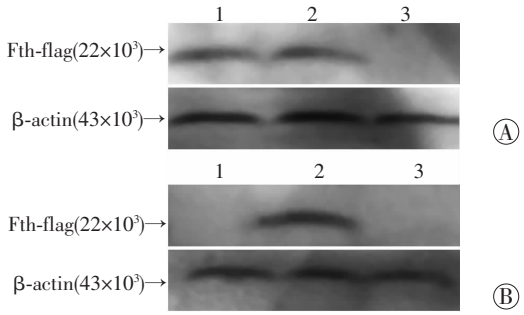
2.2 细胞Fth-flag表达检测结果

应用免疫荧光染色和Western blot检测细胞内Fth-flag表达情况，结果显示转染慢病毒Lenti-hTERT-Fth-flag-Puro载体后，只有恶性肿瘤细胞A549表达Fth-flag蛋白，正常细胞HPDLFs不表达，而转染慢病毒Lenti-CMV-Fth-flag-Puro载体后，A549和HPDLFs细胞均表达Fth-flag蛋白，未转染慢病毒载体的细胞不表达（图3、4）。



1：A549细胞；2：HPDLFs细胞

图2 Western blot检测细胞株hTERT蛋白的表达

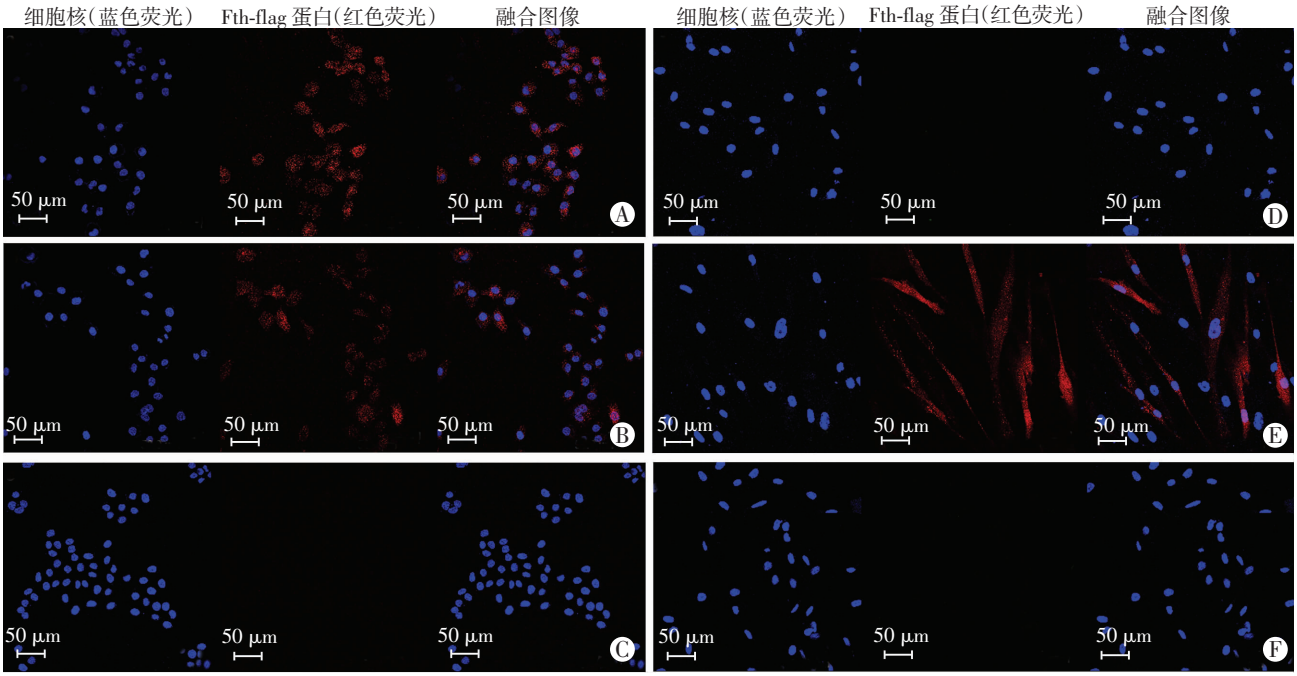


A：A549细胞；B：HPDLFs细胞；1：hTERT；2：CMV；3：Wt

图4 Western blot检测细胞Fth-flag蛋白的表达

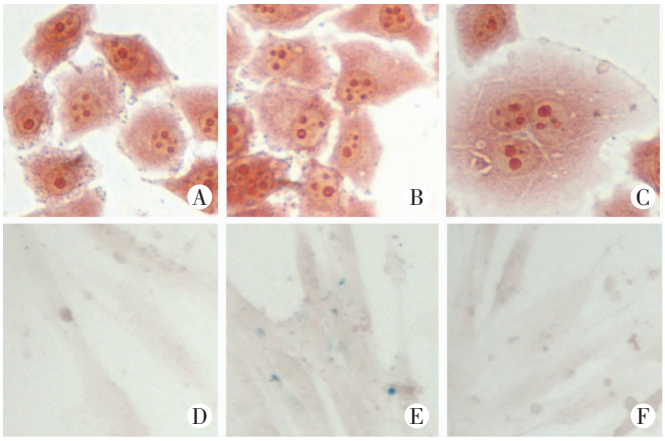
2.3 普罗氏蓝染色结果

普罗氏蓝铁染色结果显示转染慢病毒Lenti-hTERT-Fth-flag-Puro载体后，恶性肿瘤细胞A549内可见明显蓝染颗粒，正常细胞HPDLFs内未见明确蓝染颗粒，而转染慢病毒Lenti-CMV-Fth-flag-Puro载体后，2种细胞内均可见明显蓝染颗粒，未转染慢病毒载体细胞内未见明确蓝染颗粒（图5）。



A、D：分别示转染慢病毒Lenti-hTERT-Fth-flag-Puro载体的A549和HPDLFs细胞；B、E：分别示转染慢病毒Lenti-CMV-Fth-flag-Puro载体的A549和HPDLFs细胞；C、F：分别示未转染慢病毒载体的A549和HPDLFs细胞

图3 免疫荧光观察细胞Fth-flag表达



A、D：分别示转染慢病毒 Lenti-hTERT-Fth-flag-Puro 载体的 A549 和 HPDLFs 细胞；B、E：分别示转染慢病毒 Lenti-CMV-Fth-flag-Puro 载体的 A549 和 HPDLFs 细胞；C、F：分别示未转染慢病毒载体的 A549 和 HPDLFs 细胞；(A、B、C ×400；D、E、F ×200)

图 5　普罗氏蓝铁染色观察细胞摄铁能力

2.4　MR 成像

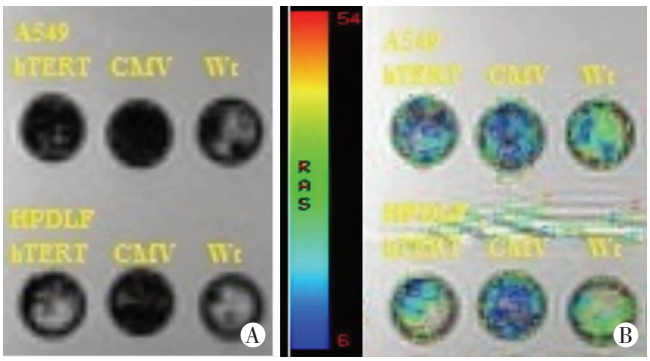
应用梯度自旋回波(GRE)序列对体外细胞进行 MR 扫描，结果显示：转染慢病毒 Lenti-hTERT-Fth-flag-Puro 载体后，恶性肿瘤细胞 A549 T_2^* WI 信号强度(SI)和 T_2^* 值较未转染细胞显著降低($P<0.05$)，而正常细胞 HPDLFs T_2^* WI 信号强度(SI)和 T_2^* 值较未转染细胞无明显差异($P>0.05$)；当转染慢病毒 Lenti-CMV-Fth-flag-Puro 载体后，A549 和 HPDLFs 细胞 T_2^* WI 信号强度(SI)和 T_2^* 值均较未转染细胞明显降低($P<0.05$)(表 1，图 6)。

表 1　不同处理组细胞 T_2^* WI 信号强度(SI)和 T_2^* 值比较

($n=5$，$\bar{x}\pm s$)

组别	A549		HPDLFs	
	T_2^* 值	SI	T_2^* 值	SI
Lenti-hTERT-Fth-flag-Puro 组	12.10±0.92[a]	1 340.86±49.21[a]	24.01±1.13	2 225.42±73.43
未转染组	21.44±1.51	2 049.08±87.58	23.38±1.71	2 148.48±54.74
Lenti-CMV-Fth-flag-Puro 组	9.61±1.17[a]	1 137.38±60.59[a]	11.54±0.74[a]	1 299.16±53.42[a]

a：$P<0.05$，与未转染组比较



A：T_2^* WI；B：T_2^* map

图 6　转染慢病毒 Lenti-hTERT-Fth-flag-Puro 载体、Lenti-CMV-Fth-flag-Puro 载体、未转染载体(Wt)细胞 MR 成像

3　讨论

端粒酶激活在肿瘤的发生、发展中起着关键作用并影响着肿瘤的预后，hTERT 启动子转录活性与 hTERT 表达水平、端粒酶活性具有高度一致性[10]。应用 hTERT 启动子控制显像报告基因表达，应用相应的成像手段，可间接实现 hTERT 启动子转录活性的非侵入性检测显像，这在靶向端粒酶的肿瘤诊断及治疗中具有重要意义。

在本研究中，应用 hTERT 启动子调控磁共振铁蛋白报告基因表达，发现铁蛋白靶向性高表达于端粒酶阳性恶性肿瘤细胞内，细胞高表达铁蛋白后摄铁量显著增加，增加的铁能改变细胞 T_2^*，引起 MR 信号发生改变，说明应用 MRI 可实现 hTERT 启动子靶向转录活性的非侵入检测、显像。由于 hTERT 启动子只在 hTERT 表达阳性的恶性肿瘤细胞内发挥转录活性，换言之，当转染慢病毒 Lenti-hTERT-Fth-flag-Puro 载体后，只有恶性肿瘤细胞会出现 MR 信号改变，所以，该成像方法亦可扩展用于恶性肿瘤的广谱靶向诊断中。

由于铁蛋白是通过获取内源性铁离子实现 MR 显像，将有效克服既往引入外源性对比剂等方法的不足，如：①外源性显像剂中的配体与相应受体特异性结合能力的活体衰减；②靶向显像剂进入体内后的一段时间内，整个靶器官均有显像剂存在，增加了背景噪声，影响了靶区的显示和观察。由于铁蛋白的 T_2^* 影响效应较外源性对比剂弱，MR 成像敏感性较低。因此，可对 MR 报告基因成像系统进行改善以获得满意的结果，如：选用高转染率载体、优化 hTERT 启动子提高报告基因表达水平、对铁蛋白进行修饰增强其聚铁能力、优化成像参数序列如采用对铁敏感的 GRE T_2^* WI、磁敏感加权成像(SWI)等，改善图像采集线圈，采用 7T 等高场强设备[11-12]。在满足显像的同时，还需评估报告基因的引入对细胞组织的影响，如铁蛋白报告基因过表达对细胞增殖活性的影响，应用到体内时是否会改变体内铁离子的分布情况，以及对能量代谢、造血、免疫功能等的影响等。

综上所述，应用 MR 铁蛋白报告基因成像技术可实现 hTERT 启动子靶向转录活性的非侵入性检测，并有望为恶性肿瘤靶向诊断提供一种全新的 MRI 方法。

参考文献：

[1] Takakura M, Kyo S, Kanaya T, *et al*. Cloning of human telomerase catalytic subunit (hTERT) gene promoter and identification of proximal

core promoter sequences essential for transcriptional activation in immortalized and cancer cells[J]. Cancer Res, 1999, 59(3): 551-557.

[2] Braunstein I, Cohen-Barak O, Shachaf C, *et al*. Human telomerase reverse transcriptase promoter regulation in normal and malignant human ovarian epithelial cells[J]. Cancer Res, 2001, 61(14): 5529-5536.

[3] Kyo S, Takakura M, Fujiwara T, *et al*. Understanding and exploiting hTERT promoter regulation for diagnosis and treatment of human cancers[J]. Cancer Sci, 2008, 99(8): 1528-1538.

[4] Gu J, Andreeff M, Roth J A, *et al*. hTERT promoter induces tumor-specific Bax gene expression and cell killing in syngenic mouse tumor model and prevents systemic toxicity[J]. Gene Ther, 2002, 9(1): 30-37.

[5] Irving J, Wang Z, Powell S, *et al*. Conditionally replicative adenovirus driven by the human telomerase promoter provides broad-spectrum antitumor activity without liver toxicity[J]. Cancer Gene Ther, 2004, 11(3): 174-185.

[6] Padmanabhan P, Otero J, Ray P, *et al*. Visualization of telomerase reverse transcriptase (hTERT) promoter activity using a trimodality fusion reporter construct[J]. J Nucl Med, 2006, 47(2): 270-277.

[7] Groot-Wassink T, Aboagye E O, Wang Y, *et al*. Noninvasive imaging of the transcriptional activities of human telomerase promoter fragments in mice[J]. Cancer Res, 2004, 64(14): 4906-4911.

[8] Arosio P, Ingrassia R, Cavadini P. Ferritins: a family of molecules for iron storage, antioxidation and more[J]. Biochim Biophys Acta, 2009, 1790(7): 589-599.

[9] Iordanova B, Ahrens E T. *In vivo* magnetic resonance imaging of ferritin-based reporter visualizes native neuroblast migration[J]. Neuroimage, 2012, 59(2): 1004-1012.

[10] Daniel M, Peek G W, Tollefsbol T O. Regulation of the human catalytic subunit of telomerase (hTERT)[J]. Gene, 2012, 498(2): 135-146.

[11] Iordanova B, Robison C S, Ahrens E T. Design and characterization of a chimeric ferritin with enhanced iron loading and transverse NMR relaxation rate[J]. J Biol Inorg Chem, 2010, 15(6): 957-965.

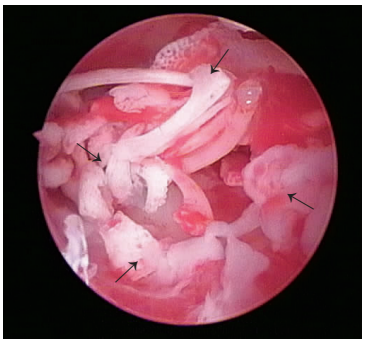
[12] Deans A E, Wadghiri Y Z, Bernas L M, *et al*. Cellular MRI contrast *via* coexpression of transferrin receptor and ferritin[J]. Magn Reson Med, 2006, 56(1): 51-59.

(**收稿**:2013-09-22;**修回**:2013-10-21)

(编辑 汪勤俭)

(上接350页)

患者于术后5个月自然妊娠,2013年2月成功分娩。



↑:示宫腔内残留胎骨组织

图1 宫内大量胎骨残留致不孕症患者宫腔镜下表现

2 讨论

宫腔内胎骨残留是一种少见的并发症,多发生于中期妊娠引产后,因钳刮不全导致部分胎儿残留宫腔[1],也可继发于慢性炎症引发的组织化生,但较罕见[2]。胎骨残留常引起功能失调性子宫出血,月经过多,痛经,盆腔疼痛,白带异常,不孕等临床表现[3],在胎骨残留的诊断中除以上临床表现外,还应注意患者均存在引产史,结合B超、宫腔镜检查等辅助检查,多可明确诊断。

本病例的罕见之处在于宫腔镜下可见近乎完整的胎儿骨骼残留,胎儿骨骼轮廓清晰,形态完整,残留骨骼数目之多及形态完整程度在类似病例中极为罕见。残留的胎骨形成宫腔异物,起到类似宫内节余器的作用,阻碍了受精卵着床而致继发不孕。本例中残留胎骨源于9年前的中期妊娠引产术,某种程度上延误了诊治。对孕12周以上要求终止妊娠者,因胎儿已成型,术前应充分软化、扩张宫颈,术后应仔细检查胎体的完整性,并对刮出物仔细核对,包括四肢、头颈等组织,术后复查B超,以及时发现异常。

胎骨残留诊断明确后应取出胎骨,手术方式多以宫腔镜为主,本例采用宫腔镜联合B超监护的方法去除残留胎骨,不仅增加了手术的安全性,减少子宫穿孔等并发症的出现,也可及时发现并清除嵌入宫壁的骨片,为手术疗效提供保证[4]。

参考文献:

[1] Harman C R, Fish D G, Tyson J E. Factors influencing morbidity in termination of pregnancy[J]. Am J Obstet Gynecol, 1981, 139(3): 333-337.

[2] Bhatia N N, Hoshiko M G. Uterine osseous metaplasia[J]. Obstet Gynecol, 1982, 60(2): 256-259.

[3] Chervenak F A, Amin H K, Neuwirth R S. Symptomatic intrauterine retention of fetal bones[J]. Obstet Gynecol, 1982, 59(6 Suppl): 58S-61S.

[4] 夏恩兰, 段华, 黄晓武, 等. 宫腔镜宫内异物取出术及其监护方法的探讨[J]. 中国实用妇科与产科杂志, 2002, 18(11): 673-674.

(**收稿**:2013-11-21;**修回**:2013-11-28)

(编辑 吴培红)