

# 蜡样芽胞杆菌在不同标本中的毒力基因分布特征

张慧娟, 张恩民, 贺金荣, 李伟, 魏建春

**摘要:目的** 研究蜡样芽胞杆菌毒力基因在不同标本中的分布特征。**方法** 分离自环境监测标本(米粉、奶粉、土壤)和疾病相关标本(米饭、凉皮、眼内炎和肿瘤患者)的蜡样杆菌 333 株,PCR 扩增蜡样杆菌 11 个毒力基因,包括溶血性 BL 基因(*hblC*、*hblD*、*hblA*、*hblB*)、非溶血性基因(*nheA*、*nheB*、*nheC*)、肠毒素 FM 基因和 T 基因(*entFM*、*bceT*)、细胞毒素 K 基因(*cytK*)和呕吐毒素相关基因(*ces*),统计不同标本菌株中毒力基因的携带数目和各毒力基因的携带率,方差分析和卡方检验比较毒力基因在不同标本中,尤其是在疾病相关标本与环境监测标本中的携带差异。**结果** 研究菌株携带毒力基因平均数目为 5.97 个,88.29% 的菌株携带至少 3 个毒力基因,12.31% 的菌株携带除 *ces* 外的所有基因。标本携带毒力基因数目从高到低依次为患者(8.75)、凉皮(8.20)、米饭(7.13)、土壤(6.22)、米粉(5.78)和奶粉(5.71)。患者、凉皮分别与奶粉的基因数目两两比较有统计学差异显著性。菌株各毒力基因的携带率从高到低依次为非溶血性基因(89.19%)、*entFM* 基因(79.88%)、*bceT* 基因(49.85%)、溶血性 BL 基因(48.35%)、*crytK* 基因(47.75%)和 *ces* 基因(1.50%)。溶血性基因在疾病相关标本中的携带率比环境监测标本高( $\chi^2 = 8.230, P < 0.01$ ),其余基因携带率则在两类标本中无统计学差异。环境监测标本中,土壤的溶血性基因携带率高于米粉和奶粉( $\chi^2 = 15.071, P < 0.01$ ),非溶血性基因和 *entFM* 基因的携带率则低于后两者,检验值分别为( $\chi^2 = 9.603, P < 0.05$ )和( $\chi^2 = 21.634, P < 0.01$ )。**结论** 蜡样杆菌毒力基因在不同标本中的分布,尤其是毒力基因数目和溶血性基因在疾病相关标本中较高的携带特点,为研究蜡样杆菌的致病性提供了一定的参考依据,具有一定的临床意义。

**关键词:**蜡样芽胞杆菌;毒力基因;疾病相关标本;分布特征

中图分类号:R378.8

文献标识码:A

文章编号:1002-2694(2019)08-0683-05

## Distribution of virulence genes of *Bacillus cereus* in several specimens

ZHANG Hui-juan, ZHANG En-min, HE Jin-rong, LI Wei, WEI Jian-chun

(State Key Laboratory of Infectious Disease Prevention and Control, National Institute for Communicable Disease Control and Prevention, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing, 102206, China)

**Abstract:** In order to investigate the distribution of virulence genes of *Bacillus cereus* in different types of specimens and evaluate the potential risk, we detected 11 virulence genes including genes encoding enterotoxin(*hblC*, *hblD*, *hblA*, *hblB*, *nheA*, *nheB*, *nheC*, *entFM*, *bceT* and *crytK*) and voitoxin(gene *ces*) with PCR method in 333 *Bacillus cereus* strains collected from food(packaged rice flour and dried milk), soil and clinical specimens(rice and cold noodles associated with food poisoning and patients). Analysis of variance and Chi square test were performed. Results showed that the average gene numbers of tested strains were 5.97, there were 8.75 genes from patients, 8.20 from cold noodles, 7.13 from rice, 6.22 from soil, 5.78 from packaged rice flour and 5.71 from dried milk, respectively. Both the numbers of virulence gene from patients and cold noodles were higher than that from dried milk and the differences were significant. The total carrying rates of genes for *nhe*, *entFM*, *bceT*, *hbl*, *crytK* and *ces* were 89.19%, 79.88%, 49.85%, 48.35%, 47.75% and 1.50%, respectively, in the 333 studied strains. The carrying rates of gene *hbl* from clinical specimens was higher than that from other specimens( $\chi^2 = 8.230, P < 0.01$ ). However, the differences for other genes were not significant between the two kinds of specimens. Comparison of intra-group differences showed that the rate for gene *hbl* from soil was higher than that from dried milk and rice flour. The rates for genes *nhe* and *entFM* from soil were lower than the latter. This study showed us the distribution of virulence genes of *Bacillus cereus* in several kinds of specimens. The higher virulence gene numbers and carrying rates of the gene *hbl* in clinical specimens suggested that the haemolytic enterotoxin might play a role in disease progression.

国家科技重大专项(No.2018ZX10712001)

通讯作者:魏建春, Email: weijianchun@icdc.cn;

ORCID: 0000-0003-1221-4906

作者单位:传染病预防控制国家重点实验室,中国疾病预防控制中心

传染病预防控制所,北京 102206

**Keywords:** *Bacillus cereus*; virulence genes; clinical specimens; distribution

Supported by the fund for Major Infectious Diseases Such as AIDS and Viral Hepatitis Prevention and Control Technology Major Projects (No. 2018ZX10712001)

Corresponding author: Wei Jian-chun, Email: weijianchun@icdc.cn

蜡样芽胞杆菌(简称蜡样杆菌)在自然界广泛分布,常存在于土壤、灰尘和昆虫中,植物和许多生熟食品中也常见,临幊上该菌被认为是一种机会致病菌常引起食源性疾病,也被认为是一种污染菌引发外伤性眼内炎、骨科创面感染以及在肿瘤等免疫低下人群中引起院内感染等肠道外感染疾病<sup>[1]</sup>。

研究表明,无论是肠道内还是肠道外感染,发病均与该菌分泌的毒素导致组织破坏或胞外酶活性产物有关,编码这些毒素的毒力基因主要包括溶血性BL基因(*hblC*、*hblD*、*hblA*、*hblB*)、非溶血性基因(*nheA*、*nheB*、*nheC*)、肠毒素FM基因和T基因(*entFM*、*bceT*)、细胞毒素K基因(*cytK*)和呕吐毒素相关基因(*ces*)<sup>[2]</sup>。但并不是所有蜡样杆菌都含有全部毒力基因,而是存在菌株间的差异,不同的毒力基因分布与疾病的严重程度呈相关性<sup>[3]</sup>。我国部分地区已在食品的常规监测中开展了蜡样杆菌的污染与毒力基因的检测工作,本研究中采集了我国12个省的不同分离来源的标本进行了毒力基因的检测,以期深入了解临床相关蜡样杆菌的遗传分布特征,为相关疾病的诊断处置提供科学的参考依据。

## 1 材料与方法

**1.1 菌株** 菌株包括分离自中国河北、海南、云南、内蒙、四川、陕西、福建等12个省的蜡样杆菌330株和购买的模式菌株3株(ATCC10876、ATCC13061和CMCC63301),分离来源分为环境监测标本(常规食品微生物监测及土壤)和疾病相关标本(食物中毒食品及肠道外感染)2大类,具体包括米粉(96株)、奶粉(125株)、土壤(92株)、米饭(8株)、凉皮(5株)、眼内炎(2株)或肿瘤患者(2株)等6种标本,所有菌株均由本室保存。

### 1.2 毒力基因检测

**1.2.1 合成引物** 针对上述的11个蜡样杆菌可能含有的毒力基因,参考文献检索引物序列<sup>[4-5]</sup>,每对引物经NCBI Blast比对验证,确为相应毒力基因片段,引物合成由北京天一辉远生物科技有限公司完成,引物序列及扩增片段长度见表1。

**1.2.2 PCR扩增** 常规煮沸法制备菌株DNA模板,普通酶链聚合反应(PCR)方法扩增所有毒力基因片段,同时设立阳性和阴性对照。PCR反应体系

表1 本研究检测毒力基因所用引物  
Tab.1 Primers for virulence genes of *B.cereus*

基因	引物	引物序列(5'-3')	长度/bp
<i>hblA</i>	HA-F	TTACCTGGTAGAATCGTA- CAAGATC	164
	HA-R	CCTGTATTAAATCGCTTCTAC- CATTG	
<i>hblB</i>	HB-F	AAGCAATGGAATACAATGGG	2 685
	HB-R	AATATGTCCCAGTACACCCG	
<i>hblC</i>	HC-F	CCTATCAATACTCTCGCAA	695
	HC-R	TTTCCTTTGTTATACGCTGC	
<i>hblD</i>	HD-F	ACCGGTAACACTATTCATGC	830
	HD-R	GAGTCCATATGCTTAGATGC	
<i>nheA</i>	NA-F	GTTAGGATCACAATCACCGC	756
	NA-R	ACGAATGTAATTGAGTCGC	
<i>nheB</i>	NB-F	GTGCAGCAGCTGTAGGCGGT	328
	NB-R	ATGTTTTCCAGC- TATCTTCGCAAT	
<i>nheC</i>	NC-F	TGGATTCCAAGATGTAATG	684
	NC-R	ATTACGACTCTGCTTGTGC	
<i>ces</i>	Nrps-F	GACAAGAGAAATTTC- TACGAGCAAGTACAAT	635
	Nrps-R	GCAGCCTCCAATTACTCCT- TCTGCCACAGT	
<i>bceT</i>	BceT-F	GACTACATTACGATTACG- CAGAA	304
	BceT-R	CTATGCTGACGAGCTACATC- CAT	
<i>entFM</i>	entFM-F	GTTCGTTCAGGTGCTGGTAC	486
	entFM-R	AGCTGGGCCTGTACGTACTT	
<i>cytK</i>	cytK-F	CGACGTACAAGTTGTAACA	565
	cytK-R	CGTGTGAAATACCCAGTT	

为25 μL,包括2×EasyTaq<sup>TM</sup> PCR SuperMix(购自北京全式金生物技术有限公司)12.5 μL,上下游引物各1 μL(浓度10 μM),DNA模板1 μL(浓度为100 ng/μL左右),加无菌超纯水补足至25 μL。PCR反应条件为95 °C预变性5 min;95 °C变性1 min,55 °C退火1 min,72 °C延伸1 min,共30循环;72 °C最后延伸5 min,产物经1%琼脂糖凝胶电

泳检测。

**1.3 结果分析** 采用 SPSS21.0 软件,检验水准为  $\alpha=0.05$  统计菌株检测阳性毒力基因的数量,单因素方差分析不同标本毒力基因数的差异;计算菌株不同毒力基因的携带率,行 $\times$ 列资料卡方检验分析不同标本毒力基因携带率的统计学差异。

## 2 结 果

**2.1 菌株毒力基因携带情况** 333 株蜡样杆菌 11 种毒力基因的检测结果显示,菌株所含毒力基因数量最少 0 个(30 株,占 9.01%),最多 10 个(41 株,占 12.31%),含 4 个毒力基因的菌株数量最多,占 19.22%,其次是 5 个(16.82%)和 9 个(16.22%),菌株平均携带毒力基因数 5.97 个。90.99% (303/333) 的菌株检出至少含有 1 个毒力基因,毒力基因在 3 个以上的菌株占到 88.29% (225/333),含有 5 个毒力基因以上的菌株占 67.57% (294/333),除呕吐毒素基因外,全部 10 个毒力基因均检出的菌株占 12.31% (41/333)(图 1)。

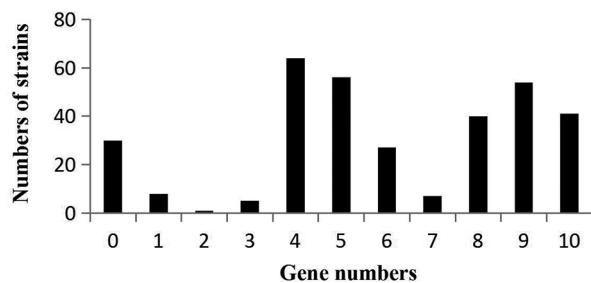


图 1 菌株携带毒力基因个数

Fig.1 Distribution of gene numbers of studied strains

**2.2 不同类型标本毒力基因数量比较** 常规食品监测的米粉和奶粉中毒力基因个数分别为 5.78 和 5.71 个,而在病例相关采集标本的米饭、凉皮和患者中基因个数分别达到了 7.13,8.2 和 8.75 个,均高于平均值,方差分析显示,6 种样品的毒力基因携带数量之间无统计学显著差异( $F=1.917, P>0.05$ ),但两两比较显示,患者与奶粉的基因个数统计学差异有显著性( $F=5.482, P<0.05$ ),凉皮与奶粉间有统计学差异显著性( $F=4.479, P<0.05$ ),其他类型样品两两间无统计学差异(表 2)。

**2.3 不同类型标本毒力基因携带率比较** 毒力基因中非溶血性基因携带率最高,同时含有 3 种非溶血性基因(*nheA*,*nheB*,*nheC*)的菌株占 61.86%,至少含有一种此基因的菌株则达 89.19%;其余基因携带率从高到低依次为 *entFM* 基因(79.88%)、*bceT*

表 2 不同样本类型蜡样杆菌毒力基因携带情况

Tab.2 Distribution of virulence gene numbers of *B.cereus* in different specimens

样品类型	样品数	毒力基因平均数
米粉	96	5.78
奶粉	125	5.71
土壤	92	6.22
米饭	8	7.13
凉皮	5	8.2
患者	4	8.75
合计	330	5.97

基因(49.85%)、溶血性 BL 基因(48.35%)、*ctyK* 基因(47.75%)和 *ces* 基因(1.50%)。其中,溶血性基因中 *hblB* 携带率较低(38.14%),其他 3 种(*hblA*、*hblC* 和 *hblD*)携带率较高。

不同类型标本毒力基因的携带率之间有差异,将样本数较少(凉皮、眼内炎和肿瘤患者)的标本除外,其余标本的各基因携带率比较显示,米饭、米粉、奶粉和土壤的溶血性基因携带率有统计学差异显著性( $\chi^2=15.071, P<0.01$ ),米粉和奶粉的携带率较低,土壤携带较高;而非溶血性基因则在土壤中携带较低,其它标本中较高( $\chi^2=9.603, P<0.05$ );*entFM* 基因也在土壤中较低,其它标本中较高( $\chi^2=21.634, P<0.01$ );*cytK*、*bceT* 和 *ces* 基因在不同标本中的携带率均无统计学差异显著性(表 3)。

将样本数较少的标本合并,比较疾病相关与环境监测两类标本的毒力基因携带情况,表 4 显示溶血性基因在疾病标本中携带较高,有统计学差异( $\chi^2=8.23, P<0.01$ ),其余基因在两类标本中的携带率无统计学差异。

## 3 讨 论

蜡样杆菌作为一种重要的食源性疾病病原菌,在食品中的污染状况和毒力基因分布近年来被广泛关注。研究数据显示,食品中的蜡样杆菌检出率多在 10% 以上,婴幼儿食品和奶粉中在 10%~30%,熟制米面制品中在 20%~30% 左右,在快餐盒饭、铁路食品及市场摊点中污染更重,有的可达 50%<sup>[6-10]</sup>,腐乳类食品和大米中的蜡样杆菌检出率可高达 80%<sup>[11-12]</sup>。同时,医院内感染中,在开放性创伤的患者伴免疫力低下人群中蜡样杆菌的分离率较高,眼内炎也较多见,外伤所致的细菌性眼内炎中蜡样杆菌感染率仅次于金黄色葡萄球菌,位居第 2,

表 3 各毒力基因在不同类型标本中的分布  
Tab.3 Distribution of virulence genes of *B.cereus* in different specimens

基因	总携带率 (n=333)	不同类型标本的基因携带率(%)							
		凉皮 (n=5)	米饭 (n=8)	米粉 (n=96)	奶粉 (n=125)	土壤 (n=92)	眼内炎 (n=2)	肿瘤患者 (n=2)	其他 (n=3)
<i>hblC</i>	48.35(161)	80(4)	62.5(5)	38.54(37)	38.4(48)	67.39(62)	100(2)	100(2)	33.33(1)
<i>hblD</i>	46.85(156)	80(4)	75(6)	38.54(37)	38.4(48)	60.87(56)	100(2)	100(2)	33.33(1)
<i>hblA</i>	45.65(152)	80(4)	62.5(5)	38.54(37)	36(45)	60.87(56)	100(2)	100(2)	33.33(1)
<i>hblB</i>	38.14(127)	80(4)	37.5(3)	32.29(31)	31.2(39)	50(46)	100(2)	50(1)	33.33(1)
同时含 4 个 <i>hbl</i>	37.24(124)	80(4)	37.5(3)	32.29(31)	29.6(37)	48.91(45)	100(2)	50(1)	33.33(1)
含任一 <i>hbl</i>	48.35(161)	80(4)	75(6)	38.54(37)	36.8(46)	68.48(63)	100(2)	100(2)	33.33(1)
<i>nheA</i>	84.38(281)	100(5)	100(8)	83.33(80)	87.2(109)	80.43(74)	50(1)	100(2)	66.67(2)
<i>nheB</i>	72.37(241)	80(4)	87.5(7)	78.13(75)	81.6(102)	52.17(48)	100(2)	100(2)	33.33(1)
<i>nheC</i>	82.28(274)	100(5)	100(8)	86.46(83)	86.4(108)	69.57(64)	100(2)	100(2)	66.67(2)
同时含 3 个 <i>nhe</i>	61.86(206)	80(4)	87.5(7)	67.71(65)	68(85)	44.57(41)	50(1)	100(2)	33.33(1)
含任一 <i>nhe</i>	89.19(297)	100(5)	100(8)	90.62(87)	93.6(117)	80.43(74)	100(2)	100(2)	66.67(2)
<i>ctxK</i>	47.75(159)	60(3)	50(4)	48.96(47)	36.8(46)	60.87(56)	50(1)	50(1)	33.33(1)
<i>ces</i>	1.50(5)	0	0(0)	1.04(1)	3.2(4)	0(0)	0(0)	0(0)	0.00
<i>entFM</i>	79.88(266)	100(5)	87.5(7)	87.5(84)	87.2(109)	59.78(55)	100(2)	100(2)	66.67(2)
<i>bceT</i>	49.85(166)	60(3)	50(4)	44.79(43)	44.8(56)	59.78(55)	50(1)	100(2)	66.67(2)

注:n 表示样本总数,括号内数字表示相应基因扩增阳性数。

表 4 疾病相关标本与环境监测标本中毒力基因携带差异  
Tab.4 Different carrying rate between clinical and environmental monitoring specimens

基因类型	疾病相关标本		环境监测标本		$\chi^2$ 值	P 值
	阳性数	阳性率(%)	阳性数	阳性率(%)		
<i>hbl</i>	14	82.35	146	46.65	8.23	0.00
<i>nhe</i>	17	100	278	88.82	1.11	0.14
<i>ctxK</i>	9	52.94	149	47.6	0.18	0.18
<i>ces</i>	0	0	5	1.6	0.24	0.77
<i>entFM</i>	16	94.12	248	79.23	1.40	0.09
<i>bceT</i>	10	58.82	154	49.2	0.60	0.15

并且进展迅速,急骤恶化,可造成视网膜毁灭性损害<sup>[13]</sup>,是医院感染中不可忽视的一种重要病原菌。

蜡样杆菌携带的毒力基因与致病性密切相关,食品中蜡样杆菌毒力基因的调查显示非溶血性基因和肠毒素 FM 基因的携带率均达 90% 左右,少数报道显示肠毒素 FM 基因和 T 基因的携带率较低,约为 20%~30%;溶血性基因和细胞毒素 K 基因的携带率不到 50%,尤其是 *hblC* 和 *hblD* 的携带率有 20%<sup>[6-7]</sup>;呕吐毒素基因的检出率最低,多在 5% 以下,但大米中含量较高,可达 13.8%<sup>[12]</sup>。

本研究中菌株来源除了常规食品监测样本外,还包含了土壤分离菌株,食物中毒、眼内炎、肿瘤患者等疾病相关标本分离菌株,重点分析了已知的蜡样杆菌 11 个毒力基因的分布特征,尤其是在疾病相关标本中的特点,可为探索毒力基因的致病性提供参考。结果显示,约 90% 的蜡样菌株携带至少 3 个毒力基因,且约 10% 的菌株携带除呕吐毒素基因外的所有毒力基因,菌株携带的平均毒力基因数目为 5.97 个,疾病相关标本所携带的毒力基因数目高于环境监测标本。各个基因的分布特点显示,与大多

数报道一致<sup>[1,6-7]</sup>,非溶血性基因和肠毒素 FM 基因在菌株中的携带率均较高,分别为 89.19% 和 79.88%,溶血性基因和细胞毒素 *cytK* 和肠毒素 T 基因的携带率均在 50% 左右,呕吐毒素携带率最低 1.50%。各毒力基因在米饭、米粉、奶粉和土壤这 4 类标本中的携带率比较显示,溶血性基因、非溶血性基因和肠毒素 FM 基因在这些标本中的分布有统计学显著差异,溶血性基因在土壤中的携带率较高,而后两者则较低。其他毒力基因在这些标本中的携带无差异。同时,溶血性基因在疾病相关标本中的携带率相比环境监测标本较高,而其余基因携带率则在两类标本中无统计学差异。由此可见,毒力基因的数目和溶血性基因对蜡样杆菌的致病性具有一定的临床意义。研究表明,溶血素 HBL 通过溶血亚基 L2,溶血亚基 L1 和结合亚基 B 蛋白共同作用形成 HBL 成孔毒素或肠毒素。这 3 个 HBL 蛋白分别由 *hblC*,*hblD* 和 *hblA* 编码,从一个操纵子共同转录,之后发现了 B'蛋白,由 *hblB* 编码,该蛋白与 B 蛋白有 73% 的同源性,位于起始的 158 个氨基酸上,且并不是所有含有 *hbl* 操纵子的菌株都含有 *hblB*<sup>[1]</sup>,本研究显示较低的携带率(38.14%)也验证了这一结果。

#### 利益冲突:无

**本文引用格式:** 张慧娟, 张恩民, 贺金荣, 等. 蜡样芽胞杆菌在不同标本中的毒力基因分布特征[J]. 中国人兽共患病学报, 2019, 35(8): 683-687. DOI: 10.3969/j.issn.1002-2694.2019.00.127

#### 参考文献:

- [1] Stenforsarnes LP, Fagerlund A, Granum PE. From soil to gut: *Bacillus cereus* and its food poisoning toxins[J]. FEMS Microbiol Rev, 2008, 32(4): 579-606. DOI: 10.1111/j.1574-6976.2008.00112.x
- [2] Bottone EJ. *Bacillus cereus*, a volatile human pathogen[J]. Clin Microbiol Rev, 2010, 23(2): 382-398. DOI: 10.1128/CMR.00073-09
- [3] 王洋, 周帽萍. 蜡样芽胞杆菌食物中毒死亡案例分析[J]. 中国食品卫生杂志, 2011, 23(2): 191-194. DOI: 10.13590/j.cjfh.2011.02.024
- [4] Guinebretière M, Broussolle V, Nguyen C. Enterotoxigenic profiles of food-poisoning and food-borne *Bacillus cereus* strains [J]. J Clin Microbiol, 2002, 40(8): 3053-3056. DOI: 10.1128/JCM.40.8.3053-3056.2002
- [5] Ehling-Schulz M, Fricker M, Scherer S. Identification of emetic toxin producing *Bacillus cereus* strains by a novel molecular assay[J]. FEMS Microbiol Lett, 2004, 232(2): 189-195. DOI: 10.1016/S0378-1097(04)00066-7
- [6] 王君. 全国食品中蜡样芽孢杆菌的污染分布规律及遗传多样性研究[D]. 广州: 广东工业大学, 2013.
- [7] 闫韶飞, 闫旭, 甘辛, 等. 我国市售婴儿配方乳粉中蜡样芽孢杆菌污染及其毒力基因调查[J]. 中国食品卫生杂志, 2015, 27(3): 286-291. DOI: 10.13590/j.cjfh.2015.03.014
- [8] 诸葛石养, 苏爱荣, 李秀桂. 广西米面制品蜡样芽孢杆菌污染分布及耐药性研究[J]. 中国卫生检验杂志, 2014, 24(18): 2661-2662, 2672.
- [9] 孙玲, 姬晓红, 张中伟, 等. 2014—2015 年西安铁路局辖区内动车快餐盒饭蜡样芽孢杆菌污染状况及实验研究[J]. 职业与健康, 2016, 32(19): 2649-2650, 2653. DOI: 10.13329/j.cnki.zyyjk.2016.0834
- [10] 马景宏, 魏彤竹, 李雪, 等. 辽宁省 2012—2015 年食源性蜡样芽孢杆菌污染检测结果分析[J]. 中国微生态学杂志, 2017, 29(1): 42-45. DOI: 10.13381/j.cnki.cjm.201701010
- [11] 周婷婷. 蜡样芽孢杆菌在腐乳中的污染状况及其控制方法研究[D]. 广州: 华南理工大学, 2013.
- [12] 蒋荣荣. 我国市售大米中食源性致病菌—蜡样芽孢杆菌的检测和致病性分析[D]. 武汉: 武汉轻工大学, 2013.
- [13] 吴晓燕, 倪侃翔, 李胜兵. 骨科创面蜡样芽孢杆菌感染临床特点及耐药性分析[J]. 中国骨伤, 2013, 26(9): 753-756. DOI: 10.3969/j.issn.1003-0034.2013.09.012

收稿日期:2019-01-07 编辑:林丹