

牡蛎中诺如病毒的分子流行病学研究进展

Molecular epidemiology of Noroviruses in oysters

柳淑芳, 苏来金, 周德庆

(农业部海洋渔业资源可持续利用重点开放实验室, 中国水产科学研究院 黄海水产研究所, 山东 青岛 266071)

中图分类号: Q959.21

文献标识码: A

文章编号: 1000-3096(2008)08-0082-05

牡蛎是重要的海产贝类,其味道鲜美,倍受人们喜爱,许多地区仍有生吃牡蛎的习惯。相关研究结果表明,牡蛎不仅是副溶血性弧菌等病原菌的携带者,也是甲型肝炎、诺如病毒(Noroviruses, NVs)等病毒的主要载体^[1]。NVs是目前习见的食物源性病毒之一^[2],近年来世界范围内相继报道多起食物因污染NVs病毒导致急性胃肠炎的暴发和散发,同时,流行病学调查也表明NVs食物性传播最主要的载体是双壳类^[1,3],从而引起了各国政府和食品科学工作者的重视。牡蛎属于滤食性动物,它们在滤食水中的微藻和有机碎屑获取食物的同时,大量富集了水体中的NVs,一只牡蛎每天滤水量高达数升,致使牡蛎特别是消化道内NVs病毒粒子的量远远高于周围水域^[4]。据报道,牡蛎体内的NVs病毒含量可以达到周围环境的100倍甚至以上。法国及日本等亚洲沿海地区的人们习惯生食贝类等海产品^[5,6],并且即便是通常采用的一些对贝类的烹调方法也不能完全消灭病毒。这些因素给食用贝类引起流行性胃肠炎的暴发带来了隐患。作者针对国内外近年来NVs的研究状况,从分子流行病学的角度综述牡蛎中NVs的研究现状。

1 NVs的基因组结构和分类

NVs是一群单股正链RNA病毒的总称,群内病毒之间的遗传学和抗原差异较大,过去曾称为有结构的小圆病毒(small round structured viruses, SRSVs),病毒基因组全长7 654个核苷酸左右,有3个开放读码框架(open reading frame, ORFs)^[7]。ORF1编码具有RNA多聚酶活性的非结构蛋白前体,为非结构蛋白,该段序列类似于微小RNA病毒的2C解旋酶、3C蛋白酶和3D RNA依赖的RNA聚合酶。ORF2编码一个530个氨基酸的蛋白,其分子质量56 571 u,该蛋白含有一个保守的PDG氨基酸抗原片段。ORF2编码衣壳蛋白,这种蛋白可以在

体外自行组装成空壳状类病毒颗粒,其外形和大小与天然病毒相似。将其免疫志愿者,并用IEM、ELISA等方法检测受感染者血清抗体,证实此蛋白有抗原性,将其免疫动物,也获得高效价的血清抗体。此外,一种分子质量约为34 ku的可溶性蛋白可能是ORF2编码的裂解产物。ORF3位于基因组的3'端,编码一个212氨基酸的小蛋白,其分子质量为22 479 u,属于强碱性蛋白,ORF3与基因库中任何蛋白质的序列都无相似之处,其作用尚不清楚。

NVs成员庞杂,目前已对其100多个分离株进行了基因测序,彼此之间变异较大,所以病毒的分类一直存在争议。目前常用的分类方法有两种,一种方法是根据RNA聚合酶区或衣壳蛋白区核苷酸和氨基酸序列的同源性将NVs分为3个基因型:基因型I(genogroup I, GD)代表株Norwalk virus(NV),包括Southampton virus(SV)、Desert shield virus(DSV)等;基因型II(GII)代表株Mexico virus(MxV),包括Hawaii virus(HV)、Mellksham virus(MKV)、Ordsdale virus、Hillingdon virus、Leeds virus、Wortley virus等;基因型GIII主要为牛源病毒,含有两个亚型,代表株分别为JV和NA-2^[8-10]。另一种分类方法是根据宿主和血清学反应将NVs病毒属分为宿主为人的HuCV I型和HuCV II型两个正式的基因型和宿主为牛的BoCV和宿主为猪的SoCV两个候选基因型,以及还没有确定基因型的宿主为鼠的Norovirus 1。此外,每个基因型包括多种变异毒株,又可分为多个亚型或簇型。作者侧重以第一种分类方法介绍NVs的分子流行病学。

收稿日期:2006-04-10;修回日期:2006-08-20

基金项目:国家863计划项目(2007AA09Z400);山东省科技攻关项目(2007GG10005015)

作者简介:柳淑芳(1975-),女,山东蓬莱人,副研究员,博士,主要从事水产品安全研究,电话:0532-85836348, E-mail:liusf@ysfri.ac.cn

2 牡蛎中 NVs 的流行

2.1 NVs 的感染流行不容忽视

NVs 是引起人急性胃肠炎等食源性疾病的主要病原^[11],正常人群发生的胃肠炎中由 NVs 引起的比例非常高。日本 1997 年 1 月至 1999 年 3 月间发生的 265 起非细菌性胃肠炎中,有 258 起(97%)均与 NVs 有关^[12]。Fankhauser 等^[13]曾对 1997 年 7 月到 2000 年 6 月之间的 284 起非细菌性胃肠炎的粪便样品进行 NVs 的检测,结果有 217 起(93%)呈现阳性。2002 年美国疾病控制中心(CDC)估计,96%的非细菌性胃肠炎暴发与 NVs 有关^[13]。加拿大的 Patrick 等^[14]曾对 1997 年 2 月到 1999 年 3 月之间发生的 59 起胃肠炎的 287 份粪便样品进行了检测,结果表明其中 88%的胃肠炎暴发与 NVs 有关。

2.2 牡蛎是 NVs 传播的重要载体

目前还没有证据表明 NVs 对牡蛎具有致病性,现已普遍认为牡蛎是 NVs 传播的重要载体,是引起胃肠炎暴发的最常见的食源。如日本 1997~1998 年暴发的 NVs 引起的胃肠炎中,有 57 起(37%)与牡蛎有关^[15]。美国 20 世纪 90 年代,因消费牡蛎而引起的胃肠炎中,至少 52%的病原为 NVs^[3]。尽管单独从牡蛎中或从粪便中检测出 NVs 的报道很多^[16,17],但在粪便中和牡蛎中同时存在相同序列的准确数据仍然很少。其主要原因是在疾病暴发中同时收集病人的粪便样品和牡蛎样品非常困难,有时即使收集到样品,也常因为牡蛎中病毒含量太低而无法进行测序^[3]。还有一些报道尽管同时从粪便和牡蛎中检测出 NVs,但却没有进行测序和分析^[18,19]。最确实的表明食用牡蛎与胃肠炎之间的因果关系的方法是从牡蛎零售商、发病病人以及牡蛎捕获海域都能分离到 NVs,且 NVs 的序列相同。美国从多起胃肠炎暴发中同时从病人粪便和食用牡蛎中检测到的 NVs 序列之间高度一致^[20]。2002 年 4 月,意大利对暴发胃肠炎病人的 24 份粪便样品和当地水产品市场上购买的 11 份牡蛎样品进行 NVs 检测,结果粪便样品中全部为阳性,牡蛎样品中 6 份为阳性,且二者的基因型完全一致^[21]。

随着牡蛎中 NVs 检测能力的提高,牡蛎消费与 NVs 相关的胃肠炎之间的流行病学联系逐渐清楚,而且证明牡蛎中的 NVs 与感染牡蛎的消费者之间有直接因果关系的证据和资料也将继续积累和丰富,这对于进一步研究 NVs 在牡蛎和人之间的传播方式更有帮助。

2.3 牡蛎中的 NVs 感染呈世界性分布

牡蛎中的 NVs 感染呈世界性分布,不仅流行范围广泛,而且病毒的变异较大,毒株的基因型也相差较多。到目前为止,世界上临海的主要国家均不同程度地发生因牡蛎中的 NVs 感染而导致的胃肠炎。美国、加拿大、法国、日本、英国、意大利、挪威、荷兰、瑞士等先后都有因牡蛎感染 NVs 而引起胃肠炎的报道。为了监测自然条件下牡蛎中 NVs 的感染情况,1995~1998 年,法国南部连续随机从污染的河床中收集牡蛎进行 NVs 监测,NVs 的阳性率为 23%。瑞士对 2001 年 11 月到 2002 年 2 月间进口的牡蛎取 87 份样品,进行 NVs 的监测,8 份样品 NVs 阳性,NVs 扩增产物的测序结果表明毒株之间变异很大^[22]。Myrmel 等^[23]于 2000 年 6 月至 2003 年 6 月期间,在挪威沿海地区选择不同的捕获时间和不同的销售地点采集不同品种的牡蛎,分别采用实时 RT-PCR 方法检测 NVs,结果 681 份样品中 NVs 的阳性率为 6.8%。Lees 等^[24]对不同污染程度的牡蛎分别用 PCR 和 Southern 杂交试验进行了验证和比较,结果从 31 份样品中检测到了 5 份阳性。

2.4 牡蛎中 NVs 毒株的基因型分布

不同国家和地区之间 NVs 分布和流行的基因型差别较大,在 GI 和 GII 等型的基础上,Ando 等^[9]认为人 NVs 还可以细分为 17 个以上的亚型,其中 GI 至少含有 4 个亚型,II 至少含有 8 个亚型,相对来说,II 型毒株的分布和流行更严重一些。Fankhauser 等^[13]对 NVs 暴发中分离到的毒株测序表明,II 基因型的毒株占 73%,GI 基因型的毒株占 26%,另一个新确定的基因亚型 GIV 占 1%。其中 II 基因型的 GII/1,4,J 亚型在暴发中占优势,占 37%;其次是基因亚型 GII/6,7,8,占 13%;基因亚型 GI/3,占 13%;基因亚型 GII/m,占 11%,Ando 等^[8]划分的 17 个亚型全部都分离到。Green 等^[25]对英国 1989~1996 年间的 20 株 NVs 流行毒株的完整衣壳蛋白基因进行了测序,结果表明这些毒株由 9 株 GI 基因型和 11 株 II 基因型组成。Green 等^[26]对 1987 年 11 月到 1988 年 2 月的 20 起暴发的胃肠炎进行检测,结果 18 起为 NVs 引起,其中 GI 基因型为 2 起,II 基因型为 16 起。

人 NVs 的这些亚型在牡蛎中均已经分离和鉴定。1987~1994 年,Sugieda 等^[18]对牡蛎中的 NVs 进行流行病学调查时,扩增的 10 份 PCR 产物中有两种不同的 NVs 基因型,分别属于 GI 和 II 型,其中有 5 份样品可以同时检测到 2 种不同型的序列,表明在同一份样品中确实存在 2 个亚型。Katayama

等^[27]对日本牡蛎中分离到的 NVs 进行序列分析,结果表明这些 NVs 分别属于 GI 的 2 个亚型和 GII 的 5 个亚型。Jothikumar 等^[28]对 38 份牡蛎样品进行了 NVs GI 和 GII 的检测,结果二者的阳性份数分别为 18 和 19 份。Nishida 等^[2]对 2001 年 12 月到 2002 年 2 月期间日本两个不同地区捕获后用于生食的 191 份日本牡蛎样品进行 NVs 的检测、定量和分型,结果从 191 份牡蛎样品中检测到 17 份阳性(9%),进化树分析显示 3 株为 GI,而 14 株为 GII,两个基因亚群都呈现明显的变异性,其中有一半左右的牡蛎中 NVs 的含量较高。

2.5 牡蛎中 NVs 的变异性

由于 NVs 毒株多种多样,缺乏完整的交叉保护和长期免疫性,所以在人们的一生中可发生重复感染。从全球范围来看,某种特定亚型的流行毒株会随着时间变化而变化,但在某个特定的季节或某些区域或全球范围内,一种亚型的 NVs 常常占流行优势。美国 1996 年 1 月~1997 年 6 月间发生的 90 起急性胃肠炎中,86 起(96%)用 RT-PCR 的方法检测到了 NVs,6%的病例源于吃了不洁的牡蛎引起^[29]。核酸序列分析说明尽管这些 NVs 毒株属于 Gwynedd virus, Toronto virus, Hawaii virus, Lordsdale virus 和 White River 等亚型,但以 Lordsdale virus 和 Toronto virus 等个别毒株明显占流行优势,如 Lordsdale virus 亚型共引起 47 起(51%),更甚者 1996 年的第一季度,83%的暴发由 Lordsdale virus 亚型的病毒引起。Gonin 等^[14]调查研究发现,1997 年 2 月~1999 年 3 月间,病毒的变异非常大,共检测到了 13 个 GII 亚型和 3 个 GI 亚型的毒株,且同一亚型内的变异可达 9~16%。这与 Vinje 等^[30]提出的某一特定季节 NVs 的流行毒株会发生漂移的结果相一致。

2.6 牡蛎中 NVs 的流行与季节的关系

NVs 的流行地区广泛,全年发病,但冬季较多见。Burkhardt 等^[1]曾对 1991 年到 1997 年由 NVs 感染牡蛎引起的 1030 例胃肠炎的发病季节进行了研究,结果发现在 12 月份发生数最多,为 692 例,其次为 11 月份,为 218 例,1 月份也有 77 例,而 2~4 月只有 43 例,5~10 月竟然无一例发生。显然, NVs 的发生与温度密切相关,温度越低,发生的可能性越大。由此可见,这些研究结果不仅揭示了流行毒株与流行环境的关系,能够准确鉴定病毒流行与地区分布之间的关系,还为寻找不同毒株的传播方式和流行规律都提供了有益的帮助和线索。

2.7 牡蛎中 NVs 的组织分布

Schwab 等^[31]通过分析牡蛎组织内病毒的分布来研究 NVs 的吸收、分布和排泄情况,结果发现不管接种病毒浓度的高低,消化道和胃均可以检测到病毒,但暴露在高浓度病毒下的检出效果更好,当牡蛎暴露在高浓度的 NVs 中时,肌肉和体液细胞才能检出 NVs。在牡蛎净化 48 h 的试验中,细菌的净化效果非常显著,可大约减少 95% 的细菌;而 NVs 的病毒滴度减少不大,用消化道进行检测时只有 7% 的病毒降低,这表明 NVs 能存在于牡蛎的消化道内和其他组织内,采用净化的方式对病毒减少效果不明显。

3 NVs 未来的流行趋势

3.1 混合感染日趋严重

自 Sugieda 等^[18]发现 NVs 的双重感染以后,牡蛎中 NVs 的多重感染越来越常见,牡蛎可以同时感染数种 NVs 毒株,另外牡蛎还可以同时感染多种其他肠道病毒,这给牡蛎的安全卫生带来了更大问题。Le 等^[32]用 RT-PCR 和杂交的方法连续 3 年对环境中的致病性肠道病毒检测,在 108 份牡蛎样品中,除数份样品感染细菌外,其余均为病毒感染,分别为 NVs(23%)、腺病毒(17%)、肠道病毒(19%)和轮状病毒(27%),而在人类污水经常流经的水域采集的牡蛎样品中病毒的阳性率略高,分别为 NVs(35%)、腺病毒(50%)、甲肝病毒(13%)、肠道病毒(45%)和轮状病毒(52%)。在其他食品或水等发生食源性感染的样品中,也可直接检测到几株不同的 NVs 或几种不同的胃肠炎病毒的混合感染。

3.2 新基因亚型的出现

Lopman 等^[33]对英国、德国和荷兰等 1995~2002 年的 NVs 流行病学资料进行了鉴定,结果发现 2002 年 NVs 的暴发明显增加,并且发现一个新的基因亚型 GIF4 基因亚型在流行中占据主要优势,分离到的该亚型多株病毒的 pol 基因发生的突变都一致。2002 年 9 个国家中有 8 个为发病率最高的一年,这些国家均检测到 GIF4 基因亚型,另有 3 个国家在春夏之际还检测到一个新基因型。由于混合感染日趋严重,尽管目前还没有足够证据表明 NVs 不同毒株之间可以产生重组,但显然这种重组的可能性正在增大。

3.3 新宿主型 NVs 的出现

最近,又先后从牛、猪甚至海豹体内分离到杯状病毒,对这些毒株进行测序和同源性比较发现,牛杯

状病毒与人 NVs GI 和 GII 基因型的同源性分别为 45%~48% 和 41%~45%, GIII 内部亚型之间的同源性仅为 68%, 其中变异最大的是毒株 Bo/Jena/80/DE, 而同一亚型内部毒株的同源性可达 96%^[34,35]。Sugieda 等^[10]用人 SRSV 的扩增引物从 1117 份猪样品中检测到了 4 份阳性, 测序表明与其他 NVs 的同源性为 58.2%~59.9%, 属于 GII 基因型, 但应为一个新的基因亚型。Farkas 等^[36]对猪体内的血清进行调查时发现, 美国 110 份猪血清中与猪 NVs 反应的样品有 78 份 (71%), 日本 266 份猪血清中反应的有 95 份 (36%), 并且美国猪血清中与 GI、GII 基因型反应的阳性率为 63% 和 52%。这些结果提出了几个问题, 如 NVs 病毒的起源以及 NVs 能否在动物与人之间进行种间传播, 这对于理解流行病学、免疫学和 NVs 宿主范围有重要意义。

参考文献:

- [1] Burkhardt W, Calci K R I. Selective accumulation may account for shellfish-associated viral illness [J]. **Appl ENL Viron Microbiol**, 2000, 66: 1 375-1 378.
- [2] Nishida T, Kimura H, Saitoh M, *et al.* Detection, quantitation and phylogenetic analysis of noroviruses in Japanese oysters [J]. **Appl ENL Viron Microbiol**, 2003, 69(10): 5 782-5 786.
- [3] Shieh Y, Monroe S S, Fankhauser R L, *et al.* Detection of Norwalk-like virus in shellfish implicated in illness [J]. **J Infect Dis**, 2000, 181 (suppl 2): 360-361.
- [4] Metcalf T G, Mullin B, Eckerson D, *et al.* Bioaccumulation and depuration of enteroviruses by the soft-shelled clam, *Mya arenaria* [J]. **Appl ENL Viron Microbiol**, 1979, 38:275-282.
- [5] Rippey S R. Infectious diseases associated with molluscan shellfish consumption [J]. **Clin Microbiol Rev**, 1994, 7:419-425.
- [6] Inouye S, Yamashita K, Yamadera S, *et al.* Surveillance of viral gastroenteritis in Japan: pediatric cases and outbreak incidents [J]. **J Infect Dis**, 2000, 181: S270-S274.
- [7] Jiang X, Wang M, Wang K, *et al.* Sequence and genomic organization of Norwalk virus [J]. **Virology**, 1993, 195:51-61.
- [8] Ando T, Noel J S, Fankhauser R L. Genetic classification of "Noroviruses" [J]. **J Infect Dis**, 2000, 181: S336-S348.
- [9] Dastjerdi A M, Green J, Gallimore C I, *et al.* The bovine Newbury agent-2 is genetically more closely related to human SRSVs than to animal caliciviruses [J]. **Virology**, 1999, 254:1-5.
- [10] Sugieda M, Nagaoka H, Kakishima Y, *et al.* Detection of Norwalk-like virus genes in the caecum contents of pigs [J]. **Arch Virol**, 1998, 143:1 215-1 221.
- [11] Atmar T L, Estes M K. Diagnosis of noncultivable gastroenteritis viruses, the human caliciviruses [J]. **Clin Microbiol Rev**, 2001, 14(1): 15-37.
- [12] Hamano M, Kuzuya M, Fujii R, *et al.* Epidemiology of acute gastroenteritis outbreaks caused by Noroviruses in Okayama, Japan [J]. **J Med Virol**, 2005, 77(2): 282-289.
- [13] Fankhauser R L, Monroe S S, Noel J S, *et al.* Epidemiologic and molecular trends of "Noroviruses" associated with outbreaks of gastroenteritis in the United States [J]. **J Infect Dis**, 2002, 186:1-7.
- [14] G6n1n P, Couillard M, dHalewyn M A. Genetic diversity and molecular epidemiology of Noroviruses [J]. **J Infect Dis**, 2000, 182:691-697.
- [15] Inouye S, Yamashita K, Yamadera S, *et al.* Surveillance of viral gastroenteritis in Japan: pediatric cases and outbreak incidents [J]. **J Infect Dis**, 2000, 181 (suppl 2): S270-S274.
- [16] Green J, Gallimore C I, Norcott J P, *et al.* Broadly reactive reverse transcriptase polymerase chain reaction for the diagnosis of SRSV associated gastroenteritis [J]. **J Med Virol**, 1995, 47: 392-398.
- [17] Lees D. Viruses and bivalve shellfish [J]. **Int J Food Microbiol**, 2000, 59:81-116.
- [18] Sugieda M, Nakajima K, Nakajima S. Outbreaks of Norwalk like virus associated gastroenteritis traced to shellfish: coexistence of two genotypes in one specimen [J]. **Epidemiol Infect**, 1996, 116:339-346.
- [19] Christensen B F, Lees D, Henshilwood K, *et al.* Human enteric viruses in oysters causing a large outbreak of human food borne infection in 1996/1997 [J]. **J Shellfish Res**, 1998, 17:1 633-1 635.
- [20] Le G F, Neill F H, Estes M K, *et al.* Detection and analysis of a small roundstructured virus strain in oysters implicated in an outbreak of acute gastroenteritis [J]. **Appl ENL Viron Microbiol**, 1996b, 62:4 268-4 272.
- [21] Prato R, Lopalco P L, Chironna M, *et al.* Norovirus gastroenteritis general outbreak associated with raw shellfish consumption in south Italy [J]. **BMC Infect Dis**, 2004, 4(1): 37.
- [22] Beuret C, Baumgartner A, Schlupe J. Virus-contaminated oysters: a three-month monitoring of oysters imported to Switzerland [J]. **Appl ENL Viron Microbiol**, 2003, 69(4): 2 292-2 297.
- [23] Myrme1 M, Berg E M, Rimstad E, *et al.* Detection of enteric viruses in shellfish from the Norwegian coast [J]. **Appl ENL Viron Microbiol**, 2004, 70(5): 2 678-2 684.

- [24] Lees D N , Henshilwood K , Green J , *et al.* Detection of small round structured viruses in shellfish by reverse transcription-PCR [J]. **Appl ENL Viron Microbiol** , 1995 , 61 :4 418-4 424.
- [25] Green J , Vinje J , Gallimore C I , *et al.* Capsid protein diversity among Noroviruses [J]. **Virus Genes** , 2001 , 23 (2) :241.
- [26] Green K Y , Belliot G , Taylor J L , *et al.* A predominant role for Noroviruses as agents of epidemic gastroenteritis in Maryland nursing homes for the elderly [J]. **J Infect Dis** , 2002 , 185 :133-146.
- [27] Katayama K , Horikoshi H S , Kojima S , *et al.* Phylogenetic analysis of the complete genome of 18 Noroviruses [J]. **Virology** , 2002 , 299 :225-239.
- [28] Jothikumar N , Lowther J A , Henshilwood K , *et al.* Rapid and sensitive detection of noroviruses by using TaqMan-based one-step reverse transcription-PCR assays and application to naturally contaminated shellfish samples [J]. **Appl ENL Viron Microbiol** , 2005 , 71 (4) :1 870-1 875.
- [29] Fankhauser R L , Noel J S , Monroe S S , *et al.* Molecular epidemiology of “Noroviruses” in outbreaks of gastroenteritis in the United States [J]. **J Infect Dis** , 1998 , 178 :1 571-1 578.
- [30] Vinje J , Green J , Lewis D C , *et al.* Genetic polymorphism across regions of the three open reading frames of “Noroviruses” [J]. **Arch Virol** , 2000 , 145 (2) :223-241.
- [31] Schwab K I , Neill F H , Estes M K , *et al.* Distribution of Norwalk virus within shellfish following bioaccumulation and subsequent depuration by detection using RT-PCR [J]. **J Food Prot** , 1998 , 61 (12) :1 674-1 680.
- [32] Le G F , Haugarreau L , Miossec L , *et al.* Three-year study to assess human enteric viruses in shellfish [J]. **Appl ENL Viron Microbiol** , 2000 , 66 :3 241-3 248.
- [33] Lopman B , Vennema H , Kohli E , *et al.* Increase in viral gastroenteritis outbreaks in Europe and epidemic spread of new norovirus variant [J]. **Lancet** , 2004 , 363 (9 410) :682-688.
- [34] Dastjerdi A M , Green J , Gallimore C I , *et al.* The bovine Newbury agent-2 is genetically more closely related to human SRSVs than to animal caliciviruses [J]. **Virology** , 1999 , 254 :1-5.
- [35] Liu B L , Lambden P R , Gunther H H , *et al.* Molecular characterization of a bovine enteric calicivirus : relationship to the Noroviruses [J]. **J Virol** , 1999 , 73 : 819-825.
- [36] Farkas T , Nakajima S , Sugieda M , *et al.* Seroprevalence of noroviruses in swine [J]. **J Clin Microbiol** , 2005 , 43 (2) :657-661.

(本文编辑:张培新)