

# 乳腺癌组织中 DNA 甲基化转移酶与多药耐药基因 *ABCG2* 表达的关系

## The Relationship between the Expression of DNA Methyltransferase and Multidrug Resistance Gene *ABCG2* in Breast Cancer

周建孟<sup>1,2</sup>/袁建辉<sup>2</sup>/姬娜娜<sup>2</sup>/  
刘建军<sup>2</sup>/庄志雄<sup>1,2,\*</sup>

ZHOU Jian-meng<sup>1,2</sup>, YUAN Jian-hui<sup>2</sup>, JI Na-na<sup>2</sup>,  
LIU Jian-jun<sup>2</sup>, ZHUANG Zhi-xiong<sup>1,2,\*</sup>

(1. 中山大学公共卫生学院, 广东 广州 510080; 2. 深圳市疾病预防控制中心, 广东 深圳 518020)

(1. School of Public Health, Sun Yat-Sen University, Guangzhou 510080; 2. Shenzhen Center for Disease Control and Prevention, Shenzhen 518020, China)

**【摘要】**背景与目的：研究乳腺癌组织中 DNA 甲基化转移酶(DNA methyltransferase, DNMT)与多药耐药基因 *ABCG2* 表达的关系, 以进一步探讨 *ABCG2* 表达的表观遗传学机制。材料与方法：用实时定量 RT-PCR 法检测 22 例乳腺癌及其匹配的癌旁组织中 DNMT1、DNMT3A、DNMT3B 和 *ABCG2* 的表达, 并采用 Spearman 等级相关分析 DNMTs 与 *ABCG2* 基因表达的相关性。结果：乳腺癌组织中 *ABCG2*、DNMT1、DNMT3A、DNMT3B mRNA 表达量显著高于癌旁组织 ( $P < 0.01$ ), 并且 DNMT3B 表达量显著高于 DNMT1 和 DNMT3A ( $P < 0.01$ ), 与 *ABCG2* 基因表达呈负相关性 ( $r = -0.664, P < 0.01$ )。结论：乳腺癌组织中 DNMT3B 可能参与了 *ABCG2* 基因的表达调控, 这为寻找药物靶点并逆转其介导的药物耐受提供了新的科学依据。

**【关键词】**乳腺癌; 甲基化转移酶; *ABCG2*; 实时定量 RT-PCR

中图分类号: R730.45

文献标识码: A

文章编号: 1004-616X(2009)03-0194-03

**【ABSTRACT】** BACKGROUND AND AIM: We investigated the relationship between the expression of DNA methyltransferase (DNMT) and multidrug resistance gene *ABCG2* in breast cancer, in order to further study the epigenetic mechanism of *ABCG2* expression. MATERIALS AND METHODS: Use real-time transcription-PCR (RT-PCR) to quantify DNMTs and *ABCG2* mRNA expressions in 22 breast cancer and their matching adjacent tissues. We also used Spearman rank test to analyze the relationship between mRNA levels of the DNMTs and target gene *ABCG2* involved in the DNMT pathway. RESULTS: Compared with adjacent tissues, the mRNA expressions of DNMTs and *ABCG2* were markedly higher in breast cancer, especially DNMT3B, which was significantly higher than that of DNMT1 and DNMT3A. There was a negative relationship between DNMT3B and *ABCG2* ( $r = -0.664, P < 0.01$ ) in breast cancer. CONCLUSION: DNMT3B may play an important role in the epigenetic mechanism of *ABCG2* expression in breast cancer, providing new scientific basis for searching the therapeutic target to reverse the multidrug resistance caused by *ABCG2*.

**【KEY WORDS】** breast cancer; DNMT; *ABCG2*; real-time quantitative RT-PCR

近年来, 乳腺癌发病率有明显上升, 并呈现年轻化趋势。而由多药耐药引起的化疗失败仍是其治疗的一大难题。多药耐药 (multidrug resistance, MDR) 基因 *ABCG2* 编码的乳腺癌耐药蛋白是最近发现的一个 ABC (ATP-binding cassette transporter) 膜转运蛋白超家族成员, 其在多药耐药中的作用不可忽视<sup>[1]</sup>, 但其表达调控

机制仍在研究之中。本课题组已有研究表明 *ABCG2* 启动子区甲基化与其表达关系密切, 我们进一步检测了 22 例乳腺癌组织中 DNA 甲基化转移酶 (DNA methyltransferase, DNMT) DNMT1, DNMT3A 和 DNMT3B 与 *ABCG2* 表达的关系, 以探讨 *ABCG2* 表达的表观遗传学调控机制。

收稿日期: 2008-10-20; 修订日期: 2009-01-20

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30500599, 30571592)

作者简介: 周建孟 (1982-) 男, 江西赣州人, 硕士研究生, 研究方向: 生化与分子毒理。

\* Correspondence to: ZHUANG Zhi-xiong, E-mail: zczhuang2007@126.com

## 1 材料与方法

**1.1 组织标本** 所选每对组织标本均为临床手术切除的癌组织及癌旁组织。将取下的组织,剪成小块后放入冻存管内,立即浸入液氮中,而后保存于 -80 °C 备用。

**1.2 RNA 的提取及 cDNA 的合成** 严格按照 Trizol 试剂盒说明书提取总 RNA。Biophotometer 仪器测定核酸  $A_{260}$  和  $A_{280}$  值,取 4  $\mu$ l 溶液用 1% 的琼脂糖凝胶电泳鉴定所抽提 RNA 的完整性。逆转录合成 cDNA(具体参照 TaKaRa 反转录说明书)。将合成的 cDNA 置于 -80 °C 备用。

**1.3 引物设计** 根据 *DNMT1*, *DNMT3A*, *DNMT3B*, *ABCG2* 及  $\beta$ -actin 基因的 cDNA 序列,在基因的保守区域,用 Primer5 设计引物。各基因 mRNA 的上下游引物:*ABCG2* 为 5'-TCCACTGCTGTGGCATTAAA-3'和 5'-TGCTGAAACACTGTTGCTC-3', 扩增片段长度为 418 bp; 内参  $\beta$ -actin 为 5'-TCCGTGGAGAAGAGCTACGA-3'和 5'-GTACTTTCGCTCAGAAGGAG-3', 扩增片段为 309 bp; *DNMT1* 为 5'-ACGACCCTGACCTCAAATAT-3'和 5'-CCATTAACACCACCTTCAAGA-3', 扩增片段为 282 bp; *DNMT3A* 为 5'-CACAGAAGCATATCCAGGA-3'和 5'-CACATTCTCAAAGAGCCAGA-3', 扩增片段 202 bp; *DNMT3B* 为 5'-AGTATCAGGATGGGAAGGAG-3'和 5'-CGATAGGAGACGAGCTTATTG-3', 扩增片段 249 bp。所有引物均由上海生工生物工程有限公司合成。

**1.4 SYBR Green II 实时定量 RT-PCR** RT-PCR 反应,25  $\mu$ l 反应体系中含 SYBR Green Mix 12.5  $\mu$ l,上下游引物各 1.0  $\mu$ l(5  $\mu$ mol/L),ROX 0.5  $\mu$ l,cDNA 1.0  $\mu$ l 及 9.0  $\mu$ l ddH<sub>2</sub>O。制订定量反应的标准曲线和溶解曲线。反应条件:95 °C 变性 10 min,然后按 95 °C  $\times$  30 s,56 °C 开始,每个循环增加 0.1 °C  $\times$  1 min,72 °C  $\times$  50 s,进行 40 个循环,最后 1 个循环后 72 °C 延伸 10 min,产物经电泳检测,结果以  $\beta$ -actin 作为内参进行相对定量分析。按公式  $N_{\text{sample}} = 2^{\Delta CT_{\text{DNMT1}} - \Delta CT_{\text{sample}}}$  计算。其中,以第一例癌组织中 *DNMT1* 相对其内参  $\beta$ -actin 的表达量  $\Delta CT_{\text{DNMT1}}$  作为 calibrate 校准值,  $\Delta CT_{\text{DNMT1}} = CT_{\text{DNMT1}} -$

$CT_{\beta\text{-actin}}$ ; 每例组织中目的基因相对其内参表达量为  $\Delta CT_{\text{sample}}$ ,  $\Delta CT_{\text{sample}} = CT_{\text{目的基因}} - CT_{\beta\text{-actin}}$ 。最后组织中目的基因相对表达量以数据  $N_{\text{sample}}$  表示,即各例组织中目的基因相对表达量为第一例组织中 *DNMT1* 相对表达量的倍数。实验重复 3 次,目的基因相对表达量  $N_{\text{sample}}$  取平均值,以  $\bar{x} \pm s$  表示,见表 1。

**1.5 统计学方法** 所有数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,用 SPSS13.0 软件进行秩和检验及 spearman 相关性分析,以  $\alpha = 0.05$  为检验水准。

## 2 结果

**2.1 实时定量 RT-PCR 的 CT 值** 经实时荧光定量 PCR 扩增后,各例乳腺癌组织及癌旁组织中内参  $\beta$ -actin 的 CT 值平均约 20 左右,目的基因 *ABCG2*、*DNMT1*、*DNMT3A*、*DNMT3B* 的 CT 值约在 25 左右,见表 1。

表 1 组织中各基因 mRNA 实时荧光定量 RT-PCR 扩增后的 CT 值  
Table 1 The CT value of ABCG2 and DNMTs mRNA amplified by real-time quantitative RT-PCR

mRNA	CT value (s)	
	Cancer tissues	Adjacent tissues
$\beta$ -actin	19.18 $\pm$ 0.10	20.57 $\pm$ 0.08
ABCG2	23.25 $\pm$ 0.22	26.34 $\pm$ 0.19
DNMT1	26.13 $\pm$ 0.25	27.65 $\pm$ 0.16
DNMT3A	26.22 $\pm$ 0.14	27.87 $\pm$ 0.10
DNMT3B	25.13 $\pm$ 0.21	26.60 $\pm$ 0.12

**2.2 DNMTs 和 ABCG2 mRNA 在癌组织及癌旁组织中的表达** *DNMTs* 和 *ABCG2* 在乳腺癌及癌旁组织中的平均表达水平,见表 2。经配对秩和检验,*DNMTs* 和 *ABCG2* mRNA 在癌组织的表达水平高于癌旁组织 ( $P < 0.01$ ); 乳腺癌组织中,*DNMT3B* 表达水平最高 ( $P < 0.01$ ),*DNMT3A* 与 *DNMT1* 表达水平差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。经 Spearman rank 检验,乳腺癌组织中 *DNMTs* mRNA 表达水平两两之间具有明显正相关性,*DNMT1* 和 *DNMT3A* ( $r = 0.572, P = 0.005$ ),*DNMT3A* 和 *DNMT3B* ( $r = 0.431, P = 0.045$ ),*DNMT1* 和 *DNMT3B* ( $r = 0.486, P = 0.032$ )。

表 2 *DNMTs* 和 *ABCG2* mRNA 在乳腺癌及癌旁组织中的表达

Table 2 The mRNA expression of DNMTs and ABCG2 in breast cancer and adjacent tissues

Tissues	Cases	DNMT1		DNMT3A		DNMT3B		ABCG2	
		$N_{\text{DNMT1}}(\bar{x} \pm s)$	$P$	$N_{\text{DNMT3A}}(\bar{x} \pm s)$	$P$	$N_{\text{DNMT3B}}(\bar{x} \pm s)$	$P$	$N_{\text{ABCG2}}(\bar{x} \pm s)$	$P$
Breast cancer	22	1.29 $\pm$ 0.39**	< 0.01*	1.15 $\pm$ 0.24**	< 0.01*	1.75 $\pm$ 0.29**	< 0.01*	2.57 $\pm$ 0.34	< 0.01
Adjacent tissues		0.77 $\pm$ 0.24		0.72 $\pm$ 0.23		0.87 $\pm$ 0.23		0.93 $\pm$ 0.31	

\* Statistical significance of *DNMT1*, *DNMT3A* and *DNMT3B* mRNA expression between breast cancer and adjacent tissues, use Wilcoxon Signed Ranks Test,  $P < 0.01$ , \*\* To analyze statistical discrepancy among *DNMT1*, *DNMT3A* and *DNMT3B* in breast cancer, also use Wilcoxon Signed Ranks Test,  $P < 0.01$ .



**2.3 癌组织中 DNMTs 和 ABCG2 mRNA 表达的关系** 在 22 例乳腺癌组织中, 经 Spearman 检验发现, DNMT1 和 DNMT3A 与 ABCG2 mRNA 表达无相关关系 ( $P > 0.05$ )。而 DNMT3B 和 ABCG2 表达存在负相关性, 并具统计学意义 ( $P < 0.01$ )。见表 3。

表 3 乳腺癌组织中 DNMTs mRNA 和 ABCG2 基因表达的相关性分析  
Table 3 Relationship between DNMTs and target gene ABCG2 in 22 breast cancer

Gene	DNMT1		DNMT3A		DNMT3B	
	<i>r</i>	<i>P</i>	<i>r</i>	<i>P</i>	<i>r</i>	<i>P</i>
ABCG2	0.263	0.238	-0.390	0.072	-0.664	<0.01

*P*: spearman rank test; *r*: correlation coefficient

### 3 讨论

DNA 甲基化是调控基因表达的表观遗传学的重要机制之一, 是在不改变 DNA 一级结构的情况下, 改变其表达活性的基因外调节途径。人类基因组中约有 40% 组织特异表达的基因启动子区 5' 端上游区存在 CpG 岛——富含 CpG 二核苷酸对的单拷贝序列<sup>[2]</sup>。参与 DNA 甲基化的酶主要有 DNMT1, DNMT3A 和 DNMT3B。DNMT1 主要起 DNA 复制后甲基化的维持, DNMT3A 和 DNMT3B 主要参与 DNA 的从头甲基化。由 DNA 甲基化转移酶将甲基基团共价结合在 CpG 二核苷酸胞嘧啶的第 5 位碳原子上, CpG 岛的甲基化与去除对维持某些组织特异表达基因的持续抑制与适时表达起着关键的作用<sup>[3]</sup>。

本研究采用实时定量 RT-PCR 技术检测了乳腺癌组织中 3 种具功能性的 DNMTs 及 ABCG2 基因的表达水平, 充分利用了该方法广泛的线性动态范围, 从而更好地检测出组织中基因的不同表达水平。结果显示所有 CT 值除内参在 20 左右外, 目的基因的表达水平均在 25 左右, 扩增曲线呈 S 形, 符合实验要求。

既往在对胃癌、肝癌、卵巢癌等癌组织的研究中发现 DNMT1, DNMT3A 和 DNMT3B 具有不同的表达水平, 并且平均表达水平要高于癌旁组织, 与 DNA 甲基化及肿瘤的发生密切相关<sup>[4-6]</sup>。本研究同样采用实时荧光定量 RT-PCR 的方法在乳腺癌组织的研究中得到了相似的结果: DNMT3B 平均表达值较高, 其次是 DNMT1 与 DNMT3A, 提示 DNMT3B 在乳腺癌组织基因甲基化中可能起到了主导作用; 而 DNMT1, DNMT3A 和 DNMT3B 之间成正相关性 ( $P < 0.01$ ), 表明 DNMTs 之间存在共同的基因调控表达途径。这些研究结果与 Roll 等<sup>[7]</sup>和 Girault 等<sup>[8]</sup>分别在乳腺癌细胞系及乳腺癌组织的研究结果相似。此外, 我们还发现乳腺癌组织中 ABCG2 mRNA 的表达平均水平较高 ( $P < 0.01$ ), 这与孙宇萍<sup>[9]</sup>及 Burger H 等<sup>[10]</sup>在乳腺癌组织中的研究结果类似。

Bailey-Dell 等<sup>[11]</sup>研究发现 ABCG2 启动子区存在广泛的甲基化岛。既往对肾癌<sup>[12]</sup>、多发性骨髓瘤<sup>[13]</sup>及肺癌<sup>[14]</sup>等的研究表明, ABCG2 基因启动子区甲基化与其表达呈负相关性。本课题组的研究表明在乳腺癌组织中 ABCG2 基因启动子甲基化与其表达密切相关<sup>[15]</sup>, 且发现 DNMT3B 与 ABCG2 基因表达也呈负相关性, 提示 DNMTs 可能通过影响启动子的低甲基化从而促进 ABCG2 表达, 这与 Kenneth<sup>[12]</sup>在肾癌中的研究结果类似。本研究分析发现 DNMT1、DNMT3A 的表达均与 ABCG2 基因的表达无明显相关关系 ( $P > 0.05$ ), 而 Oh Bk 等<sup>[5]</sup>及 Girault 等<sup>[8]</sup>分别在肝细胞癌及乳腺癌的研究中发现 DNMT1 和 DNMT3A 与其他某些基因表达密切相关, 提示可能 DNMTs 在不同组织或(和)对不同基因的表达所起的主导作用不一样。Roll<sup>[7]</sup>和 Girault<sup>[8]</sup>分别在乳腺癌细胞系及乳腺癌组织中研究发现 DNMT3B 在调控某些基因的表达中起了重要作用。本研究结果显示 DNMT3B 与 ABCG2 基因表达之间具有负相关性 ( $P < 0.01$ ), 表明 DNMT3B 表达的降低可能有利于促进 ABCG2 基因表达。

目前研究者们均达成了共识, 表观遗传学机制中 DNMTs 的表达状态影响着细胞基因的表达调控。Hirofumi 等<sup>[14]</sup>在体外研究发现使用 DNMT 抑制剂后, 可明显提高 ABCG2 mRNA 的表达, 从而提示可以通过 DNMT 途径来调控 ABCG2 基因的表达。本研究发现的乳腺癌组织中 DNMT3B 与 ABCG2 基因表达之间的密切相关性, 为从表观遗传学机制之中寻找确定药物靶点并逆转 ABCG2 介导的药物耐受提供了新的科学依据。

### 参考文献:

- [1] Doyle LA, Yang W, Abruzzo LV, et al. A multidrug resistance transporter from human MCF-7 breast cancer cells [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95(26): 15665 - 15670.
- [2] Bird AP. CpG-rich islands and the function of DNA methylation [J]. *Nature*, 1986, 321(6067): 209 - 213.
- [3] Baylin SB, Herman JG, Graff JR, et al. Alterations in DNA methylation: a fundamental aspect of neoplasia [J]. *Adv Cancer Res*, 1998, 72: 141 - 196.
- [4] Saito Y, Kanai Y, Sakamoto M, et al. Expression of mRNA for DNA methyltransferases and methyl-CpG-binding proteins and DNA methylation status on CpG islands and pericentromeric satellite regions during human hepatocarcinogenesis [J]. *Hepatology*, 2001, 33(3): 561 - 568.
- [5] Oh Bk, Kim H, Park HJ, et al. DNA methyltransferase expression and DNA methylation in human hepatocellular carcinoma and their clinicopathological correlation [J]. *Int J Mol Med*, 2007, 20(1): 65 - 73. (下转第 200 页)

他们定义甲基化率超过 15% 的为异常甲基化, 结果表明 CpG 岛的甲基化异常与 *maspin* 基因失活相关。本实验采用 BSP 方法研究了 24 例乳腺癌组织的 *maspin* 基因启动子 13 个 CpG 位点的甲基化状况, 结果甲基化率为 98.72%, 提示启动子 CpG 岛的高甲基化率可能与乳腺癌的发生密切相关。结合本实验 *Maspin* 蛋白表达的结果, 我们支持 Futscher 等<sup>[3]</sup>和 Khalkhali-Ellis<sup>[10]</sup>的启动子异常甲基化是 *maspin* 基因在乳腺癌中失活的重要途径的观点。本实验的甲基化率高于 Futscher 等<sup>[3]</sup>的研究结果, 我们认为这可能是不同种族之间的差异, 也可能是研究的标本不同的原因(他们是石蜡切片, 本实验是新鲜组织标本), 具体原因还有待继续研究。Futscher 等<sup>[3]</sup>认为 *maspin* 启动子异常甲基化是乳腺癌发生的早期事件, 我们拟进一步研究乳腺癌及其邻近组织、正常乳腺组织中 *maspin* 基因启动子 CpG 岛甲基化情况, 明确 *maspin* 启动子甲基化在乳腺癌发生发展中的作用, 以期探讨乳腺癌的早期诊断和治疗的新方法。

### 参考文献:

- [1] Veronesi U, Boyle P, Goldhirsch A, et al. Breast cancer[J]. Lancet, 2005, 365(9472): 1727 - 1741.
- [2] Mercatali L, Valenti V, Calistri D, et al. RT-PCR determination of maspin and mammaglobin B in peripheral blood of healthy donors and breast cancer patients[J]. Ann Oncol, 2006, 17(3): 424 - 428.
- [3] Futscher BW, O' Meara MM, Kim CJ, et al. Aberrant methylation of the maspin promoter is an early event in human breast cancer[J]. Neoplasia, 2004, 6(4): 380 - 389.
- [4] Toillon RA, Lagadec C, Page A, et al. Proteomics demonstration that normal breast epithelial cells can induce apoptosis of breast cancer cells through insulin-like growth factor-binding protein-3 and maspin[J]. Mol Cell Proteomics, 2007, 6(7): 1239 - 1247.
- [5] Beltran A, Parikh S, Liu Y, et al. Re-activation of a dormant tumor suppressor gene maspin by designed transcription factors[J]. Oncogene, 2007, 26(19): 2791 - 2798.
- [6] Cella N, Contreras A, Latha K, et al. Maspin is physically associated with [beta] 1 integrin regulating cell adhesion in mammary epithelial cells[J]. FASEB J, 2006, 20(9): 1510 - 1512.
- [7] 刘巍, 张祥宏, 张志刚, 等. 新辅助化疗对乳腺癌组织 *Maspin* 蛋白表达的影响[J]. 中国肿瘤临床, 2004, 31(12): 667 - 670.
- [8] Clark SJ, Harrison J, Paul CL, et al. High sensitivity mapping of methylated cytosines[J]. Nucleic Acids Res, 1994, 22(15): 2990 - 2997.
- [9] Schneider SS, Schick C, Fish KE, et al. A serine proteinase inhibitor locus at 18q21.3 contains a tandem duplication of the human squamous cell carcinoma antigen gene[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1995, 92(8): 3147 - 3151.
- [10] Khalkhali-Ellis Z. Maspin: the new frontier[J]. Clin Cancer Res, 2006, 12(24): 7279 - 7283.
- [6] 陈春玲, 燕鑫, 高雨农, 等. 卵巢上皮性癌组织中 DNA 甲基转移酶亚型 mRNA 的表达及其意义[J]. 中华妇产科杂志, 2005, 40(11): 770 - 774.
- [7] Roll JD, Rivenbark AG, Jones WD, et al. DNMT3B overexpression contributes to a hypermethylator phenotype in human breast cancer cell lines[J]. Mol Cancer, 2008, 7(1): 15.
- [8] Girault L, Tozlu S, Lidereau R, et al. Expression analysis of DNA methyltransferases 1, 3A, and 3B in sporadic breast carcinomas[J]. Clin Cancer Res, 2003, 9(12): 4415 - 4422.
- [9] 孙宇萍, 王树滨, 陈亦欣, 等. 乳腺癌耐药蛋白在乳腺癌组织中的表达及其预后的关系[J]. 中国癌症杂志, 2004, 14(2): 123 - 126.
- [10] Burger H, Foekens JA, Look MP, et al. RNA expression of breast cancer resistance protein, lung resistance-related protein, multidrug resistance-associated proteins 1 and 2, and multidrug resistance gene 1 in breast cancer: correlation with chemotherapeutic response[J]. Clin Cancer Res, 2003, 9(2): 827 - 836.
- [11] Bailey-Dell KJ, Hassel B, Doyle LA, et al. Promoter characterization and genomic organization of the human breast cancer resistance protein (ATP-binding cassette transporter G2) gene[J]. Biochim Biophys Acta, 2001, 1520(3): 234 - 241.
- [12] Kenneth KW, Zhan Z, Susan EB. Aberrant promoter methylation of the *abcg2* gene in renal carcinoma[J]. Mol Cell Biol, 2006, 26(22): 8572 - 8585.
- [13] Joel GT, Jana L, et al. ABCG2 expression, function, and promoter methylation in human multiple myeloma[J]. Blood, 2006, 108(12): 3881 - 3889.
- [14] Hirofumi N, Yoichi N, Hiroshi S et al. Methylation status of breast cancer resistance protein detected by methylation-specific polymerase chain reaction analysis is correlated inversely with its expression in drug-resistant lung cancer cells[J]. Cancer, 2008, 112(5): 1122 - 1130.
- [15] 袁建辉, 周建孟, 庄志雄, 等. 乳腺癌组织 ABCG2 基因启动子区甲基化状况与其表达[J]. 中国热带医学, 2008, 8(11): 1900 - 1902.

(上接第 196 页)