

· 论 著 ·

改良支原体培养鉴定方法的探索*

蔡高台¹, 程灿灿², 张洪荣¹, 李榕娇¹, 周彩容¹, 陈宪楷¹, 尹小毛^{3△}

(1. 南方医科大学第五附属医院检验科, 广东广州 510900; 2. 广州市番禺区中心医院检验科, 广东广州 515400; 3. 广州医科大学附属顺德医院检验科, 广东佛山 528315)

摘要:目的 探讨改良支原体培养鉴定方法, 从而获取更准确的支原体培养鉴定及药物敏感性试验结果。**方法** 收集患者的阴道分泌物进行支原体培养。对照组按试剂说明书进行处理和结果判断, 试验组则将对对照组中培养 4 h 的瓶中培养物分配至新的试剂条中, 其余步骤同对照组。比较两组培养鉴定及药物敏感性试验结果是否有差异, 同时对两组药物敏感性试验结果有差异的标本进行培养物的 DNA 提取、耐药基因扩增及测序, 分析有药物敏感性改变的菌株是否存在耐药基因突变。**结果** 共检测标本 32 份, 其中出现菌落数差异 16 份, 药物敏感性差异 12 份, 3 份标本同时出现菌落数差异及药物敏感性差异。在喹诺酮药物敏感性结果有差异的标本中检出 parC 基因的 C248T(S83L) 突变, 另外发现 parC 基因的 C398T(P133L) 和 L22 基因的 A406G (I136V) 两个突变, 临床意义有待进一步研究。**结论** 通过改良支原体培养鉴定方法, 支原体的阳性率有所提高, 药物敏感性试验结果也发生了变化, 但结果准确性还需进一步的临床试验验证。

关键词: 支原体; 培养; 耐药; 突变

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2020.20.012

中图法分类号: R446.5

文章编号: 1673-4130(2020)20-2481-05

文献标识码: A

Improvement of the cultivation and identification method for Mycoplasma*

CAI Gaotai¹, CHENG Cancan², ZHANG Hongrong¹, LI Rongjiao¹,
ZHOU Cairong¹, CHEN Xiankai¹, YIN Xiaomao^{3△}

(1. Department of Clinical Laboratory, The Fifth Affiliated Hospital of Southern Medical University, Guangzhou, Guangdong 510900, China; 2. Department of Clinical Laboratory, Guangzhou Panyu Central Hospital, Guangzhou, Guangdong 515400, China; 3. Department of Clinical Laboratory, The Affiliated Shunde Hospital of Guangzhou Medical University, Foshan, Guangdong 528315, China)

Abstract: **Objective** To explore an improved identification method for Mycoplasma culture and obtain more accurate identification and drug susceptibility results of Mycoplasma specimens. **Methods** The vaginal secretions of patients were collected for Mycoplasma culture. The control group was treated according to the instructions of reagents and the results were judged. For the experimental group, the culture cultivated for 4 hours from the control group was assigned to a new reagent strip. The other steps were the same as those for the control group. The differences of culture identification and drug susceptibility between the two groups were recorded. Then DNA was extracted from two groups of culture with different drug susceptibility, and the related drug resistance genes were amplified by PCR and sequenced. Finally, whether there was evidence of drug resistance related gene mutations in the strains with drug susceptibility changes was explored. **Results** Thirty-two samples were tested, including 16 samples with different colony numbers and 12 samples with different drug sensitivity. Among them, three samples showed different colony numbers and drug susceptibility at the same time. The C248T (S83L) mutation of parC gene was detected in the samples with different quinolone susceptibility results between the two groups. In addition, two mutations of parC gene C398T (P133L) and L22 gene A406G (I136V) had been found. The clinical significance needs further study. **Conclusion** The positive rate of Mycoplasma culture has been improved and the results of drug susceptibility has been changed by improving the identification method of Mycoplasma culture, but the accuracy of the results needs further

* 基金项目: 广东省科技计划项目(2014A020212173); 广州市番禺区科技计划项目(2017-Z04-43); 广州市番禺区中心医院硕博士科研基金项目(2016-S-07)。

作者简介: 蔡高台, 女, 技师, 主要从事实验室诊断方向的研究。△ 通信作者, E-mail: yinxiaomaoandy@sina.com。

本文引用格式: 蔡高台, 程灿灿, 张洪荣, 等. 改良支原体培养鉴定方法的探索[J]. 国际检验医学杂志, 2020, 41(20): 2481-2484.

clinical and experimental verification.

Key words: Mycoplasma; culture; drug resistance; mutation

支原体是常见的泌尿生殖道病原体,主要包括解脲脲原体(Uu)、微小脲原体(Up)、人型支原体(Mh)和生殖支原体(Mg)等,可引起成人和婴儿的多种感染^[1]。除了 Mg 外,其他支原体的实验室诊断主要通过培养来实现^[2]。目前,有许多商业诊断试剂盒用于支原体的培养、鉴定和药物敏感性试验,其中支原体 IST2 试剂盒被广泛用于 Mh 和脲原体(本文将 Uu 和 Up 统称为脲原体)的检测。采用 IST2 试剂盒对黏液标本进行培养时,包裹在黏液中的支原体很难被释放,将导致支原体在液体培养基中分布不均,使后续的菌落计数和药物敏感性试验结果出现偏差。本研究将通过延长标本洗脱后放置时间来解决这一问题。具体内容如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集 2016 年 11—12 月在妇科门诊就诊或住院的患者阴道分泌物标本 32 份,均为带有浓稠黏液或透明黏液的标本。

1.2 仪器与试剂 FAST 96-WELL 型 PCR 扩增仪购自美国 Applied Biosystems 公司,凝胶成像仪购自 Bio-Rad 公司。Taq DNA 聚合酶、dNTPs、DNA Marker 1000 均购自 TaKaRa 公司,DNA 提取液购自中山大学达安基因股份有限公司,支原体培养、鉴定、药物敏感性一体化试剂盒购自法国生物梅里埃公司。引物合成及测序服务均由生工生物工程(上海)股份有限公司提供。

1.3 方法

1.3.1 培养及分组 按照试剂盒说明书进行标本的接种及结果判断。对照组:支原体培养基溶解后,将阴道分泌物拭子在培养基中进行洗脱,然后取培养液加入检测试条的反应孔中(每孔 50 μL),用液体石蜡封闭后直接放入温箱中孵育,剩余液体培养物也放入温箱中孵育。试验组:4 h 后取出剩余液体培养物并再次混匀,然后取一张新的检测试条,将培养液加入检测试条的反应孔中(每孔 50 μL),后续试验步骤同对照组。观察记录两组检测试条在试验结束时的药物敏感性及菌落数差异。

1.3.2 脲原体 DNA 提取 对于药物敏感性有差异的菌株,取其液体培养物上清液 400 μL,12 000 r/min 离心 5 min 后弃上清液,加灭菌生理盐水 1 mL,充分混匀后 12 000 r/min 离心 5 min 并弃上清液;沉淀中加入 50 μL DNA 提取液,充分混匀后 100 ℃温浴 10 min,冷却后 12 000 r/min 离心 5 min,取上清液备用。

1.3.3 PCR 扩增及测序 以提取的脲原体 DNA 为模板,采用 PCR 扩增相关耐药基因并进行测序分析。所涉及的引物序列见表 1。PCR 反应条件:95 ℃预变性 5 min;95 ℃变性 15 s,退火 30 s(各片段温度参考表 1),72 ℃延伸 1 min,35 个循环;最后 72 ℃延伸 10 min。PCR 反应结束后用 1%琼脂糖凝胶电泳检测扩增产物,并将 PCR 产物送公司进行测序。

表 1 引物列表

基因 ^[3]	引物	产物长度(bp)	退火温度(℃)
gyrA	5'-TTGCTGCTTTTCGAAAACGG-3'	336	50
	5'-CTGATGGTAAAACACTTGG-3'		
gyrB	5'-CCTGGTAAATTAGCTGACTG-3'	310	55
	5'-TTCGAATATGACTGCCATC-3'		
parC	5'-ACGCAATGAGTGAATTAGG-3'	309	55
	5'-CACTATCATCAAAGTTTGGAC-3'		
parE	5'-ATGGGCGGAAAATTAACGC-3'	313	55
	5'-CTTGATGTGACTACCATCG-3'		
tetM	5'-TTATCAACGGTTTATCAGG-3'	397	50
	5'-CGTATATATGCAAGACG-3'		
23S rRNA ^[4]	5'-GTGAAATCCTGGTGAGGGTGA-3'	625	55
	5'-TTCCTACGGGCATGACAGATAG-3'		
L4	5'-TCTATTGATGGTAACTTCGC-3'	392	55
	5'-GTTGAAGGTGTTTCTAAATCGC-3'		
L22	5'-TTCGCACCGTAAAGCTTCTC-3'	458	55
	5'-GTTCTGGATCAACGTTTTTCG-3'		

1.4 统计学处理 参照已报道的支原体标准株 Up ATCC 700970 (GenBank 序列号: AF222894) 和 Uu

ATCC 33699 (GenBank 序列号: CP001184) 的 gyrA、gyrB、parC、parE, 23S rRNA 基因、L22、L4 蛋白基

因,分析耐药菌株的各基因序列的突变情况并进行氨基酸预测,tetM 基因分析为检测 PCR 产物是否有扩增目标条带。分析有药物敏感性改变的菌株是否有耐药基因突变。

2 结 果

2.1 菌落数差异 根据实验设计入组标准,符合条件的标本共 32 份,其中出现菌落数差异 16 份,存在药物敏感性差异 12 份,其中 3 份标本同时出现菌落数差异及药物敏感性差异。见表 2。

2.2 药物敏感性差异 在两组药物敏感性比较中,出现差异的有 12 份,具体差异情况见表 3。

2.3 相关耐药基因检测及突变情况 在出现药物敏感性差异的菌株中,选择 8 株菌进行了相关耐药基因

检测。其中 1 号菌只检测 tetM 基因,电泳结果发现确实存在该基因。其余 7 株菌的检测情况见表 4。

表 2 两组中菌落数差异情况

菌落数及结果模式 (CFU/mL)		标本量 (n)
对照组	试验组	
无菌无药物敏感性试验	豚原体<10 ⁴	2
无菌无药物敏感性试验	豚原体>10 ⁴	1
豚原体<10 ⁴	豚原体>10 ⁴	3
豚原体<10 ⁴	豚原体<10 ⁴ , Mh<10 ⁴	1
豚原体<10 ⁴ , Mh<10 ⁴	豚原体>10 ⁴ , Mh<10 ⁴	5
豚原体>10 ⁴ , Mh<10 ⁴	豚原体>10 ⁴ , Mh>10 ⁴	2
豚原体>10 ⁴	豚原体>10 ⁴ , Mh<10 ⁴	2

表 3 两组中 12 份标本对不同药物的敏感性差异

编号	DOX		TET		JOS		ERY		AZI		CLA		CIP		OFL	
	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B
1	I	R	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
2	—	—	—	—	—	—	S	I	S	I	—	—	—	—	—	—
3	—	—	—	—	—	—	—	—	S	I	—	—	—	—	—	—
4	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	S	R	—	—	—	—
5	—	—	—	—	—	—	—	—	S	I	—	—	—	—	—	—
6	—	—	—	—	S	I	I	R	—	—	S	I	I	R	—	—
7	—	—	S	R	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
8	—	—	—	—	—	—	—	—	S	I	—	—	I	R	I	R
9	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	S	I
10	—	—	—	—	S	I	S	R	—	—	S	I	—	—	I	R
11	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	R	I
12	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	I	R	S	I

注:DOX 为多西环素;TET 为四环素;JOS 为交沙霉素;ERY 为红霉素;AZI 为阿奇霉素;CLA 为克拉霉素;CIP 为环丙沙星;OFL 为氧氟沙星。A 为对照组;B 为试验组。S 为敏感;I 为中介;R 为耐药;— 为表示两组结果无差异。编号为 6、7 和 10 的标本同时出现菌落数的差异。

表 4 耐药相关基因在药物敏感性差异菌株中的突变情况

编号	大环内酯类			喹诺酮类			
	23S rRNA	L22	L4	gyrA	gyrB	parC	parE
2	N	G361T(A121S)	N	—	—	—	—
		A406G(I136V) *					
		C422T(T141D)					
3	N	N	N	—	—	—	—
5	N	N	N	—	—	—	—
8	N	G196A(D66N)	N	N	N	G270C C398T(P133L) *	T1473C
9	—	—	—	T228C	N	T240C T375C C398T(P133L) *	T1473C
10	N	N	N	N	N	N	N
12	—	—	—	N	N	C248T(S83L) *	N

注:— 为表示未发生相应的药物敏感性差异,未做相关的耐药基因检测。N 为表示检测未发现碱基突变及氨基酸突变。* 表示碱基突变导致的氨基酸改变可能导致耐药。

3 讨 论

脲原体和 Mh 是泌尿生殖道最常见的两种病原体,其感染可导致女性宫颈炎、子宫内膜炎、输卵管炎等,男性尿道炎、慢性前列腺炎、附睾炎等。据报道支原体的感染以单纯的脲原体感染较多^[5],感染人群以女性为主^[6-7]。支原体“金标准”检测方法为液体培养与固体培养相结合的方法^[8],但由于该方法耗时长、步骤多而较难满足临床需求。目前临床较常用的检测方法是液体培养鉴定加药物敏感性试验,但是该方法常常因黏液影响而检测不准确,改进培养方法有助于提高支原体培养的阳性率和药物敏感性试验的准确性。

在本研究中,试验组与对照组存在菌落数差异比例达到 50%(16/32),试验方法明显提高了支原体的检出率。在相应的药敏试验中也出现了差异,有 11 株出现了耐药等级的升高,而仅有 1 株是耐药等级的降低,这也说明可能较浓稠的黏液在液体培养基中分配不均,导致结果不稳定。

本研究对药物敏感性试验结果有差异的菌株进行了耐药基因检测,并发现了耐药突变位点。23S rRNA 基因及核糖体蛋白 L22 及 L4 基因的突变,是目前造成大环内酯类耐药的主要原因^[9]。本研究中 L22 蛋白的基因突变位点较多,其中 G361T(A121S)和 C422T(T141I)是两个较典型的突变多态性位点,也有研究报道 G196A(D66N)为突变多态性位点^[10]。通常认为这种氨基酸多态性与耐药无关。但 A406G(I136V)位点并未见报道过,是否与大环内酯类耐药相关也无临床及实验证据,尚需进一步研究。

旋转酶是由 *gyrA* 和 *gyrB* 基因编码,拓扑异构酶 IV 由 *parC* 和 *parE* 基因编码。研究显示,4 个基因的喹诺酮耐药决定区域(QRDRs)突变与支原体对该类药物的耐药有关^[11]。本研究检测了 4 株脲原体上述 4 个基因中的 QRDRs 突变情况。其中 *parC* 基因的 C248T(S83L)突变,可能与左氧氟沙星的耐药有关^[12]。另外 C398T 位点突变造成 133 位氨基酸由 P 变成 L,该位点暂未发现有报道与喹诺酮类相关。脲原体耐药机制复杂,除 QRDRs 基因突变外,还有其他相关耐药机制如形成生物被膜等^[13]。因此,其余菌株未检测到喹诺酮相关突变耐药基因也可能对喹诺酮类药物耐药。

支原体对四环素类药物耐药与 *tetM* 基因携带及表达相关^[14]。本研究检测的 1 号菌株携带 *tetM* 基因,这极有可能是其对四环素类药物不敏感的原因。据报道,携带 *tetM* 蛋白的 Mh 表现为对四环素的不同程度的耐药,而对多西环素则可以表现为敏感^[15]。关于脲原体的研究则表明,*tetM* 蛋白使其对耐四环素类药物的贡献并不确定^[3]。在大多数的脲原体调查研究中,其对四环素类药物相对较敏感,*tetM* 基因的检出并不多见。但 *tetM* 基因通常位于脲原体的染色

体可转移性元件上,快速传播的风险比较高,因此更应受到重视。

4 结 论

本研究对支原体鉴定药敏试剂盒的培养方法作了部分修改,以便培养带有黏液的标本时得到更准确的结果。结果发现支原体的阳性率有所提高,药物敏感性试验结果也发生了变化,但其结果的变化是否准确反映菌种耐药分子特征尚不能确定。对耐药基因的检测则发现 *parC* 基因的 C398T(P133L)和 L22 基因的 A406G(I136V)两个突变,其耐药相关性尚需进一步研究。

参考文献

- [1] SONG T, YE A, XIE X, et al. Epidemiological investigation and antimicrobial susceptibility analysis of urea plasma species and *Mycoplasma hominis* in outpatients with genital manifestations[J]. J Clin Pathol, 2014, 67(9): 817-820.
- [2] ZENG X Y, XIN N, TONG X N, et al. Prevalence and antibiotic susceptibility of *Ureaplasma urealyticum* and *Mycoplasma hominis* in Xi'an, China[J]. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2016, 35(12): 1941-1947.
- [3] BEETON M L, CHALKER V J, MAXWELL N C, et al. Concurrent Titration and Determination of Antibiotic Resistance in *Ureaplasma* Species with Identification of Novel Point Mutations in Genes Associated with Resistance[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2009, 53(5): 2020-2027.
- [4] DONGYA M, WENCHENG X, XIAOBO M, et al. Transition mutations in 23S rRNA account for acquired resistance to macrolides in *Ureaplasma urealyticum*[J]. Microb Drug Resist, 2008, 14(3): 183-186.
- [5] 陈潇楷, 钟月春. 1 780 例泌尿生殖道标本支原体培养与药敏结果分析[J]. 中国当代医药, 2019, 26(9): 158-160.
- [6] 杨书才, 唐景云, 周杰, 等. 6 493 例泌尿生殖道感染患者解脲支原体和人型支原体感染情况及药敏试验分析[J]. 检验医学与临床, 2019, 16(13): 1888-1891.
- [7] 刘亚丽, 张文娟, 王洁, 等. 脲原体属和人型支原体体外药物敏感性及其对喹诺酮类药物耐药机制分析: 单中心回顾性研究[J]. 协和医学杂志, 2019, 10(3): 249-256.
- [8] 王莉平, 资捷, 易辉. 女性泌尿生殖道感染患者解脲支原体与人支原体培养及耐药性分析[J]. 中华医院感染学杂志, 2007, 17(5): 612-614.
- [9] GOVENDER S, GQUNTA K, LE ROUX M, et al. Antibiotic susceptibilities and resistance genes of *Ureaplasma parvum* isolated in South Africa[J]. J Antimicrob Chemother, 2012, 67(12): 2821-2824.
- [10] XIAO L, CRABB D M, DUFFY L B, et al. Mutations in ribosomal proteins and ribosomal RNA confer macrolide resistance in human *Ureaplasma* spp[J]. Inter J Antimicrob Agents, 2011, 37(4): 377-379.
- [11] FERNÁNDEZ J, KARAU M J, CUNNINGHAM S A, et al. Antimicrobial Susceptibility and Clonality(下转第 2488 页)

对神经信号的传导能力,改善机体各器官、系统间的协调能力。

本研究结果表明,经过 6 周的治疗,观察组患者治疗总有效率达到 97.78%,明显高于对照组的 72.97% ($P<0.05$)。说明单纯使用帕罗西汀治疗抑郁症的效果并不明显,联合运动行为干预可以有效提高抑郁症的临床治疗效果,改善患者的预后情况。TMT 与 WCST 两项测试的结果表明,观察组的认知功能明显优于对照组 ($P<0.05$)。说明认知功能障碍是抑郁症患者的主要表现之一,也是患者疾病治疗的重点与难点。常规的药物治疗并不能有效改善患者的认知功能,因此,许多患者仅接受常规药物治疗时的效果并不明显。但通过实施运动行为干预有助于患者的神经功能重塑,通过刺激海马细胞的生长、增殖,能够有效帮助患者恢复认知功能,从而改善患者的治疗效果,促进患者的病情恢复。对比两组患者 GABA 水平结果可知,治疗前,两组患者 GABA 水平差异无统计学意义 ($P>0.05$),治疗后观察组 GABA 水平明显高于对照组 ($P<0.05$)。说明神经功能障碍是导致抑郁症的主要因素之一,帕罗西汀虽然可以提高 5-HT 在突触间隙内的表达水平,但仅通过药物作用,患者的单胺类神经递质水平仍无法显著提高,需要通过运动干预,促进患者 GABA 水平上升,改善患者的临床疗效。治疗后,观察组患者 HAMD、ADL 评分均明显低于对照组 ($P<0.05$),说明帕罗西汀联合运动行为干预可以有效改善抑郁症患者的心理状态,提高患者的日常生活能力,改善患者的生活质量。

4 结 论

帕罗西汀联合运动行为干预治疗抑郁症的疗效显著,可以有效改善患者认知功能,提高机体 GABA 水平,值得进行临床推广。

参考文献

[1] 张红胜,孙丽新. 动力性心理治疗联合帕罗西汀对抑郁症

的临床效果及心理状态分析[J]. 临床研究,2019,27(11):48-50.

[2] 黄海涛. 认知行为疗法联合帕罗西汀与帕罗西汀单用治疗抑郁症的效果对照分析[J]. 中国实用医药,2018,13(21):189-190.

[3] 杜远,王龙,张许来,等. 运动对抑郁症状、认知功能和 γ -氨基丁酸影响的对照研究[J]. 中华全科医学,2019,17(9):1547-1550.

[4] 张峰,林正华,张莉莉,等. 帕罗西汀配合八段锦运动疗法对抑郁患者的临床效果观察[J]. 中国现代药物应用,2017,11(11):109-111.

[5] GUHA M. Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders:DSM-5 (5th edition)[J]. Ref Rev,2014,28(3):36-37.

[6] 朱蓓英,尹肖雯. 重复经颅磁刺激联合运动疗法对抑郁症患者认知功能和血清炎症细胞因子水平的影响[J]. 中国现代医学杂志,2019,29(22):113-117.

[7] 张明园. 精神科评定量表手册[M]. 长沙:湖南科学技术出版社,1998:16-153.

[8] 付红红,杨林杰. 海马 γ -氨基丁酸在抑郁症中的作用[J]. 广东医学,2019,40(21):3100-3103.

[9] 苗浩飞,刘炫君,吕思慧,等. 抑郁症认知功能损害的相关基因研究进展[J]. 中国神经精神疾病杂志,2019,45(10):628-631.

[10] 张丽颖,胡昔权,郑海清,等. 运动训练对高血压大鼠认知功能及脑内血管内皮一氧化氮合酶的影响[J]. 中国康复医学杂志,2019,34(8):888-894.

[11] 赵影,袁林. 百合地黄汤联合帕罗西汀对老年抑郁症患者睡眠质量及 NIHSS 评分的影响[J]. 中国现代医药杂志,2019,21(4):51-53.

[12] 刘波,叶友宝. 加味柴胡汤辅助帕罗西汀治疗抑郁症及对血清 IL-2 和 TNF- α 水平影响[J]. 中华中医药学刊,2019,37(1):239-242.

(收稿日期:2020-02-18 修回日期:2020-05-21)

(上接第 2484 页)

of Clinical Ureaplasma Isolates in the United States[J]. Antimicrob Agents Chemother,2016,60(8):4793-4798.

[12] KAMIYA Y,SHIMADA Y,ITO S,et al. Analysis of the quinolone-resistance determining region of the gyrA gene and the analogous region of the parC gene in Ureaplasma parvum and Ureaplasmaurealyticum detected in first-void urine of men with non-gonococcal urethritis[J]. J Antimicrob Chemother,2013,68(2):480-482.

[13] FENG C,HUANG Y,YU Y,et al. Effects on quinolone resistance due to the biofilm formation activity in Ureaplasmaurealyticum[J]. Turkish J Med Sci,2015,45(1):55-60.

[14] TZIMOULA K,MARIA E,EUDOXIA D,et al. Detection of the tetM resistance determinant among phenotypically sensitive Ureaplasma species by a novel real-time PCR method[J]. Diagn Microbiol Infect Dis,2015,81(2):85-88.

[15] BLANCHARD A,CRABB D M,DYBVIG K,et al. Rapid detection of tetM in Mycoplasma hominis and Ureaplasmaurealyticum by PCR: tetM confers resistance to tetracycline but not necessarily to doxycycline[J]. FEMS Microbiol Lett,1992,74(2/3):277-281.

(收稿日期:2020-02-02 修回日期:2020-07-15)